



# Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:

N. VA2002 A 000060

Invenzione Industriale



Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

29 DIC. 2003

Roma, li .....

IL DIRIGENTE

D.ssa Maria Luisa FOCA'

## AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

## MODULO A



## A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione STMicroelectronics S.r.l. codice 00951900968  
 Residenza Agrate Brianza (MI)  
 2) Denominazione \_\_\_\_\_ codice \_\_\_\_\_  
 Residenza \_\_\_\_\_

N.G.

SR

## B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome e nome Barbaro Gaetano ed altri cod. fiscale \_\_\_\_\_  
 denominazione studio di appartenenza SOCIETA' ITALIANA BREVETTI S.p.A.  
 via Piazza Repubblica n. 5 città VARESE cap 21100 (prov) VA

## C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via \_\_\_\_\_ n. \_\_\_\_\_ città \_\_\_\_\_ cap \_\_\_\_\_ (prov) \_\_\_\_\_  
 classe proposta (sez/cl/scl) \_\_\_\_\_ gruppo/sottogruppo \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

## D. TITOLO

"METODO DI ANALISI DI IMMAGINI RILEVATE DA UN MICRO-ARRAY E RELATIVO DISPOSITIVO"

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI  NO  SE ISTANZA: DATA \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ N. PROTOCOLLO

## E. INVENTORI DESIGNATI cognome nome

cognome nome

1) ALESSI Enrico 3)  
 2) CUCE' Giovanni 4)

## F. PRIORITA'

nazione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	allegato S/R	SCIOLGIMENTO RISERVE Data	N° Protocollo
1)					_____ / _____ / _____	_____
2)					_____ / _____ / _____	_____

## G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

## H. ANNOTAZIONI SPECIALI

## DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.	SCIOLGIMENTO RISERVE Data	N° Protocollo
Doc. 1) 2 PROV <input type="checkbox"/> n. pag. 46 riasunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)	_____ / _____ / _____	_____
Doc. 2) 2 PROV <input type="checkbox"/> n. tav. 15 disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)	_____ / _____ / _____	_____
Doc. 3) 1 RIS <input type="checkbox"/> lettera d'incarico	_____ / _____ / _____	_____
Doc. 4) 0 RIS <input type="checkbox"/> designazione inventore	_____ / _____ / _____	_____
Doc. 5) 0 RIS <input type="checkbox"/> documenti di priorità con traduzione in italiano	_____ / _____ / _____	_____
Doc. 6) 0 RIS <input type="checkbox"/> autorizzazione o atto di cessione	_____ / _____ / _____	_____
Doc. 7) 0 RIS <input type="checkbox"/> nominativo completo del richiedente	_____ / _____ / _____	_____

8) attestati di versamento, totale lire QUATTROCENTOSETTANTADUE/56 obbligatorio

COMPILATO IL 22/11/2002

FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I)

Il Mandatario

CONTINUA (SI/NO) NODEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA (SI/NO) SI

Gaetano BARBARO  
N° Iscr. Albo 994 B

CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA ARTIGIANATO E AGRICOLTURA DI

VARESE

codice 12

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

VA/2002/A/0060

Reg. A

L'anno duemiladue, il giorno VENTIDUE del mese di NOVEMBRE  
 Il (i) richiedente (I) sopraindicato (I) ha (hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopariportato.

## ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

NESSUNA

IL DEPOSITANTE  
  
 LUISELLA NERO



L'UFFICIALE ROGANTE  
  
 ZORZI

## RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

NUMERO DOMANDA **VAI 2002 IA/0060** REG. A

NUMERO BREVETTO

## A. RICHIEDENTE (I)

Denominazione

STMicroelectronics S.r.l.

Residenza

Agrate Brianza (MI)

DATA DI DEPOSITO

DATA DI RILASCIO

**22 NOV. 2002**

## D. TITOLO

**"METODO DI ANALISI DI IMMAGINI RILEVATE DA UN MICRO-ARRAY E RELATIVO DISPOSITIVO"**

Classe proposta (sez./cl./scl.)

(gruppo/sottogruppo)

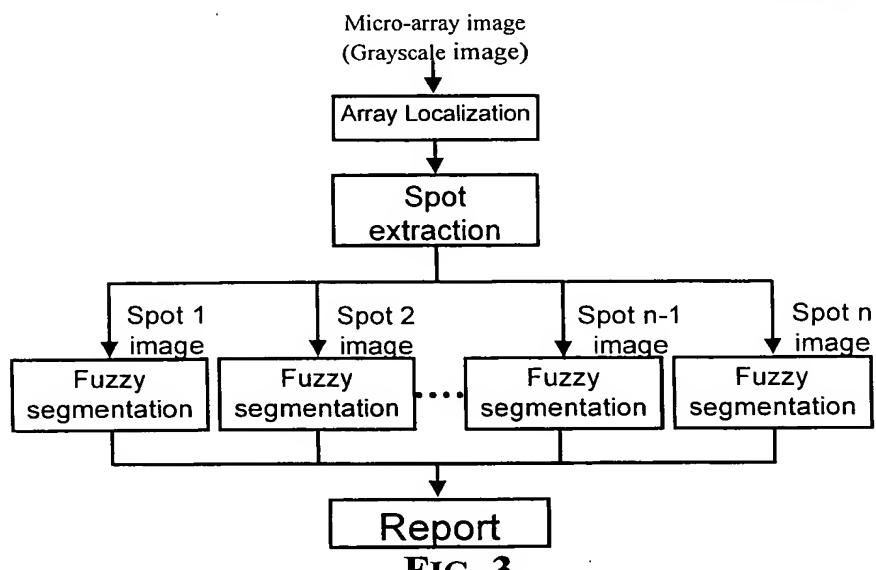
## L. RIASSUNTO

In un metodo di analisi di immagini rilevate da micro-array, l'isolamento degli spot è effettuato in maniera automatica, riducendo inoltre i tempi di elaborazione. Secondo un approccio innovativo, gli spot luminosi vengono filtrati e isolati senza far ricorso all'intervento dell'operatore, utilizzando una tecnica di filtraggio morfologico. Gli spot così isolati vengono successivamente analizzati, secondo un altro aspetto innovativo dell'invenzione, con un algoritmo fuzzy.

Questo metodo è implementato in hardware da un dispositivo di analisi di immagini rilevate da micro-array configurato secondo un'architettura di rete neurale cellulare.



## M. DISEGNO





*Titolare: STMicroelectronics S.r.l.*

**22 NOV. 2002**

**“METODO DI ANALISI DI IMMAGINI RILEVATE DA UN MICRO-  
ARRAY E RELATIVO DISPOSITIVO”**

**CAMPO DELL’INVENZIONE**

La presente invenzione concerne i metodi di analisi automatica di immagini e più in particolare un metodo e relativo dispositivo di analisi di immagini acquisite da micro-array che utilizza una tecnica di filtraggio morfologico.

**BACKGROUND DELL’INVENZIONE**

Le tecniche di analisi di immagini rilevate trovano applicazione in vari campi, quali ad esempio l’individuazione di oggetti fotografati da un satellite e l’estrazione dei relativi pixel dal resto dell’immagine.

L’analisi di immagini è di cruciale importanza anche nello studio del DNA. In passato è stata sviluppata una tecnica per l’analisi del DNA basata sui cosiddetti DNA chip. Secondo un metodo sviluppato dalla Stanford University, i DNA chip vengono realizzati depositando frammenti di DNA, detti anche sonde (“probes”), mediante microdepositazione robotizzata e immobilizzati chimicamente su slides da microscopio, ad esempio di dimensioni pari a 25mm x 76mm ± 0,5mm e di spessore pari a 1,02mm ± 0,5mm, di silicio, plastica, nylon o vetro. Le sonde, che corrispondono al gene di cui si vuole rilevare la presenza, sono poste sulla slide da microscopio secondo una disposizione a matrice (micro-array), in aree definite (spot).

Per verificare se il gene di un individuo contiene una mutazione, vengono prelevati dal sangue dell’individuo stesso un campione sospetto di



22 NOV. 2002

DNA ed un campione che non contiene mutazioni dello stesso gene (reference). I campioni di DNA vengono quindi separati in singoli trefoli, tagliati in frammenti più piccoli e maneggevoli ed etichettati con tinte fluorescenti. Ad esempio il DNA sano viene colorato con una tinta rossa e quello da analizzare con una tinta verde. A questo punto, entrambi i campioni sono inseriti nel DNA-chip e, sfruttando lo spontaneo accoppiamento dei filamenti complementari (fenomeno dell'ibridazione), sono lasciati ibridare con le sonde contenute nel DNA-chip.

Se il gene da analizzare non contiene mutazioni, entrambi i campioni ibridano allo stesso modo con la sequenza complementare immobilizzata sul DNA chip. Se il gene invece contiene mutazioni, il DNA normale (rosso) ibrida normalmente con il DNA del chip, ma il DNA da analizzare (verde) non presenta ibridazione nella regione corrispondente alla mutazione.

Utilizzando uno scanner confocale il DNA chip viene quindi sottoposto a due diverse scansioni con lunghezza d'onda relativa ai coloranti impiegati. Le due immagini ottenute (CY3 e CY5) vengono elaborate da uno specifico programma al computer che è in grado di analizzare in base all'intensità della fluorescenza se un gene è espresso o meno.

L'intensità dei pixel componenti gli spot nelle due immagini è proporzionale al numero di molecole coloranti, e quindi al numero di sonde ibridizzate con il campione contenuto nella posizione corrispondente. Confrontando le immagini ottenute (matching) è possibile identificare i geni che hanno subito mutazioni.

Va precisato che qualsiasi analisi di matching è effettuata solamente dopo che il livello del segnale per ogni singolo spot per entrambi i canali è



22 NOV. 2002

stato normalizzato rispetto al rispettivo tono (livello di grigio) dei pixel di background presente. Inoltre è necessaria un'ulteriore operazione di normalizzazione tra le immagini ottenute con i due canali dal momento che la rispettiva intensità media di spot corrispondenti cambia a seconda del colorante usato.

Con questa tecnica si può studiare il modo in cui i vari geni sono attivati o disattivati per creare certi tipi di cellule. Ad esempio, se un gene è espresso in un certo modo, esso genera una cellula normale, mentre se è espresso in un altro modo genera una cellula tumorale. Confrontando le diverse espressioni dei geni potrebbe essere possibile in futuro diagnosticare con largo anticipo e prevenire la formazione del cancro. Potrebbe inoltre essere possibile correlare le variazioni del DNA di una persona con reazioni a particolari sostanze, quali le droghe.

L'elaborazione delle immagini acquisite da micro-array è resa complessa dal fatto che le immagini stesse all'interno di un stesso ciclo di esperimenti su un campione di DNA presentano delle caratteristiche differenti. Ciò è dovuto in parte al processo con cui esse sono generate ed in parte all'acquisizione. Tali operazioni sono influenzate sia dall'intervento non ripetibile dell'operatore che dall'imprecisione degli strumenti.

La Figura 1 mostra 48 spot luminosi di un'immagine, di buona qualità, acquisita da micro-array avendo trattato con un colorante (singolo canale) campioni di DNA dopo l'ibridazione. Filtrando l'immagine è possibile notare alcune caratteristiche tipiche di tutte le immagini di micro-array, indicate sull'immagine filtrata di Figura 2.

Gli spot luminosi a sinistra rappresentano "probes" di DNA, visibili in

22 NOV. 2002

maniera abbastanza nitida nell'immagine filtrata. Questi spot sono tra di loro separati, piccoli, compatti e sostanzialmente circolari, localizzati su uno sfondo più scuro (background). Inoltre esiste un rumore (noise) localizzato dipendente dal singolo processo di fabbricazione ed imprevedibile. Questo rumore causa una variazione del tono (livello di grigio) del background e dello spot luminoso, che rappresenta il segnale utile.

In generale, l'analisi di immagini di micro-array viene effettuata eseguendo le operazioni di:

- localizzazione (array localization), che consiste nel determinare la posizione e la forma degli spot;
- estrazione (spot extraction), che consiste nell'isolare singoli spot luminosi,
- segmentazione (intra-spot segmentation), che consiste nell'esaminare ciascuno spot distinguendo pixel di segnale da pixel di sfondo (background) o di rumore,
- misura della qualità (spot quality measurement), che consiste nel ricavare parametri caratteristici dello spot ed indici che ne determinano la qualità.

In generale, si può affermare che le tecniche attualmente utilizzate non sono totalmente automatiche ma prevedono un intervento rilevante dell'operatore che, pur permettendo di effettuare un posizionamento (tuning) preciso, nei limiti delle caratteristiche del sistema, introduce un errore umano non trascurabile. Inoltre l'intervento dell'operatore, non essendo ripetibile con precisione, rende i risultati finali difficilmente confrontabili tra loro.

Il processo di localizzazione è l'operazione che prevede il maggiore intervento da parte dell'operatore, che deve centrare ogni singolo spot all'interno di una rispettiva cella di una microgriglia. Questa operazione





22 NOV. 2002

risulta alquanto onerosa dal momento che tipicamente le immagini prese in considerazione contengono 10000 e più spot distribuite su diverse griglie.

Allo stato dell'arte questa operazione è sostanzialmente semiautomatica. Le tecniche di localizzazione permettono di posizionare automaticamente la griglia, ma comunque è sempre necessaria una sistemazione finale, da parte dell'operatore, per correggere gli errori dell'algoritmo di posizionamento.

Una volta posizionata la griglia, viene generata una mappa binaria che definisce i confini degli spot luminosi sullo sfondo. Questa mappa viene usata per isolare gli spot luminosi, che poi vengono esaminati con una tecnica di segmentazione.

Le tecniche di segmentazione più note per la discriminazione di pixel di segnale da quelli di background all'interno di uno spot luminoso sono di seguito riportate:

1. Pure Spatial segmentation,
2. Pure Intensity-based segmentation,
3. Mixed Spatial/Intensity segmentation,
4. Mixed Spatial/Statistics segmentation,
5. Mixed Spatial, Intensity, Statistics & Morphology segmentation.

La tecnica di *Pure Spatial segmentation* si basa sulla assunzione che tutti i pixel interni ad un cerchio (o un'altra forma geometrica) di diametro preselezionato dall'operatore sono pixel di segnale, mentre quelli interni ad una area limitrofa, di forma e distanza selezionata dall'operatore, sono pixel di background. In questo caso la discriminazione dei pixel è fatta solamente prendendo in considerazione la loro posizione.

22 NOV. 2002



La tecnica *Pure Intensity-based segmentation* prevede di considerare solamente i pixel all'interno di una unica area in cui è localizzato lo spot ed in base alla intensità del livello dei pixel interni discrimina la parte relativa al segnale da quella dello sfondo. In questo caso la discriminazione dei pixel è fatta solamente prendendo in considerazione l'intensità dei livelli di grigio.

Con la terza tecnica di segmentazione (*Mixed Spatial/Intensity segmentation*) l'intensità dei pixel è l'elemento discriminante tra pixel di segnale e pixel di sfondo, ma in due diverse regioni, quella circolare e quella circostante. Questa tecnica si basa sia su una caratterizzazione spaziale che sull'intensità dei valori.

Secondo la tecnica *Mixed Spatial/Statististics segmentation* si calcola con metodi statistici la soglia (livello di grigio) che discrimina un pixel di segnale da un pixel di sfondo. L'intensità dei pixel interni alla zona circolare è quindi confrontata con tale soglia.

La tecnica *Mixed Spatial, Intensity, Statitistics & Morphology segmentation* si basa su una conoscenza statistica a priori ottenuta da un'analisi locale degli spot, sulla distribuzione dell'intensità luminosa e sulle caratteristiche morfologiche degli spot stessi.

Le caratteristiche principali prese in considerazione come indici di qualità e di confronto tra spot sono le mediane dei toni (livelli di grigio) rispettivamente dei pixels di segnale e dei pixels di sfondo (background). In generale non vengono considerate eventuali caratteristiche morfologiche degli spot che possono essere utili nella fase di finale di validazione dei risultati.

Il fatto che sia necessario l'intervento dell'operatore per analizzare le

22 NOV. 2002



immagini di micro-array rende l'analisi non riproducibile con sufficiente accuratezza. Di conseguenza, qualsiasi operazione di matching è viziata all'origine da un errore umano che può portare a conclusioni errate.

#### SCOPO E SOMMARIO DELL'INVENZIONE

È stato trovato ed è l'oggetto dell'invenzione un metodo di analisi di immagini rilevate da micro-array in cui l'isolamento degli spot è effettuato in maniera automatica, riducendo inoltre i tempi di elaborazione.

Secondo un approccio innovativo, gli spot luminosi vengono filtrati e isolati senza far ricorso all'intervento dell'operatore, utilizzando una tecnica di filtraggio morfologico. Gli spot così isolati vengono successivamente analizzati, secondo un altro aspetto innovativo dell'invenzione, con un algoritmo fuzzy.

Più precisamente, un oggetto dell'invenzione è un metodo di analisi di immagini rilevate da micro-array sotto forma di uno o più spot luminosi su uno sfondo, comprendente le seguenti operazioni:

- determinare forme e relative posizioni di detti spot sull'area del micro-array (array localization) generando una mappa binaria di pixels definente confini degli spot luminosi sullo sfondo,
- isolare ciascuno spot mediante un'operazione di estrazione (spot extraction) usando la mappa binaria,
- esaminare gli spot mediante un'operazione di segmentazione (intra-spot segmentation) identificando con un criterio prestabilito pixel appartenenti ad uno stesso cluster,
- per ciascuno spot, determinare relativi parametri caratteristici ed indici di qualità.



22 NOV. 2002

Il metodo dell'invenzione non richiede l'intervento dell'operatore per isolare i singoli spot in quanto la mappa binaria è generata con una tecnica di filtraggio morfologico comprendente le operazioni di:

- filtrare un'immagine rilevata da microarray con almeno un filtro morfologico generando una corrispondente immagine 'marker' dello sfondo;
- ricostruire lo sfondo effettuando un'operazione di ricostruzione sull'immagine 'marker', generando una corrispondente immagine ricostruita di sfondo;
- generare un'immagine filtrata della luminosità dello sfondo effettuando un'operazione *top-hat* sull'immagine ricostruita e detta immagine rilevata da microarray;
- generare la mappa binaria mediante un'operazione di thresholding sull'immagine filtrata della luminosità dello sfondo.

Questo metodo è implementato in hardware da un dispositivo di analisi di immagini rilevate da micro-array configurato secondo un'architettura di rete neurale cellulare.

Un ulteriore oggetto dell'invenzione è un metodo di identificazione di pixel di un'immagine appartenenti ad uno stesso oggetto rappresentato su uno sfondo, comprendente scandire i pixel dell'immagine, calcolare un valore caratteristico per ciascun pixel con un algoritmo fuzzy avente come antecedenti

- il tono di un pixel,
- la distanza tra il tono del pixel e il valore medio del tono di rispettivi pixel di sfondo,





22 NOV. 2002

– il quadrato di questa distanza;

e contemplante le operazioni di calcolare il valore medio del tono di pixel di sfondo e giudicare i pixel scanditi come appartenenti ad uno stesso oggetto se il loro valore caratteristico eccede una soglia prestabilita.

Questo metodo è implementato in un relativo sistema fuzzy di identificazione.

L'invenzione è più precisamente definita nelle annesse rivendicazioni.

#### BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

I diversi aspetti e vantaggi dell'invenzione risulteranno ancor più evidenti attraverso una descrizione dettagliata dell'invenzione facendo riferimento ai disegni allegati, in cui:

la **Figura 1** mostra un'immagine rilevata da micro-array;

la **Figura 2** mostra l'immagine della Figura 1 filtrata;

la **Figura 3** mostra un diagramma a blocchi di una forma preferita di realizzazione del metodo di analisi di immagini dell'invenzione;

la **Figura 4** mostra lo schema dei filtri morfologici da effettuare su un'immagine rilevata da micro-array secondo una forma preferita di realizzazione del metodo di analisi di immagini dell'invenzione;

la **Figura 5** mostra uno spot luminoso da filtrare, con la relativa mappa dei livelli;

le **Figure da 6 a 9** mostrano spot, con le relative mappe dei livelli, ottenuti mediante successivi filtri dello spot di Figura 5 con i filtri morfologici indicati in Figura 4;

la **Figura 10** mostra uno spot, con la relativa mappa dei livelli, di un'immagine di sfondo ottenuta effettuando un'operazione di ricostruzione



22 NOV. 2002

sullo spot di Figura 9;

la **Figura 11** mostra uno spot filtrato da rumore, con la relativa mappa dei livelli, ottenuto effettuando un'operazione di top-hat sugli spot di Figure 5 e 10;

la **Figura 12** è un diagramma di flusso dell'operazione di array localization secondo una forma di realizzazione preferita del metodo di analisi di immagini dell'invenzione;

la **Figura 13** descrive schematicamente l'operazione di estrazione di spot del metodo di analisi di immagini dell'invenzione;

la **Figura 14** è un diagramma di flusso di un algoritmo di identificazione di cluster (clustering) di un'immagine;

le **Figure da 15 a 20** illustrano il funzionamento dell'algoritmo di identificazione di cluster (clustering) descritto in Figura 14;

le **Figure da 21 a 25** illustrano l'algoritmo di identificazione di cluster (clustering) descritto in Figura 14 per eseguire l'operazione di estrazione di spot di un'immagine rilevata da micro-array;

la **Figura 26** descrive un sistema di estrazione (spot extraction) di spot luminosi su uno sfondo di immagini rilevate da micro-array;

la **Figura 27** è un diagramma di simulazione del sistema fuzzy dell'invenzione in corrispondenza di pattern di allenamento corrispondenti a due spot con livelli differenti;

la **Figura 28** è un diagramma di funzioni membro usate nell'algoritmo fuzzy dell'invenzione relative al tono di un pixel;

la **Figura 29** è un diagramma di funzioni membro usate nell'algoritmo fuzzy dell'invenzione relative alla distanza tra il tono di un pixel e il valore

22 NOV. 2002



medio del tono dei rispettivi pixel di sfondo;

la **Figura 30** è un diagramma di funzioni membro usate nell'algoritmo fuzzy dell'invenzione relative al quadrato della distanza tra il tono di un pixel e il valore medio del tono dei rispettivi pixel di sfondo;

la **Figura 31** è un diagramma dei conseguenti dell'algoritmo fuzzy dell'invenzione;

le **Figure da 32 a 40** mostrano come calcolare parametri caratteristici ed indici di qualità degli spot isolati con il metodo dell'invenzione.

#### DESCRIZIONE DI ALCUNE FORME DI REALIZZAZIONE DELL'INVENZIONE

Secondo un aspetto innovativo dell'invenzione, l'operazione di localizzazione è effettuata mediante filtri morfologici. Poiché le forme di interesse degli spot sono approssimabili a dei cerchi di diametro non superiore ad una certa lunghezza, e quindi appartenenti ad una particolare classe di figure geometriche simmetriche rispetto al loro centro, è possibile progettare dei filtri morfologici servendosi di opportune *Opening* direzionali.

Preferibilmente, si usa una cascata di quattro filtri morfologici con rispettive *Opening* che impiegano come elemento strutturante (*structuring set*) segmenti di lunghezza non superiore al massimo diametro dello spot e diretti lungo le due direzioni fondamentali di un piano cartesiano (X, Y) e lungo le due diagonali principali ( $D_1, D_2$ ), come schematicamente riassunto in Figura 4.

In alternativa, è possibile utilizzare anche filtri morfologici diversi da quelli citati come ad esempio un unico filtro morfologico avente uno *structuring set* formato da quattro segmenti che si intersecano in un unico punto e suddividono il piano in otto angoli uguali. Da prove effettuate si è

22 NOV. 2002



visto che in quest'ultimo caso si ottengono, in genere, risultati peggiori rispetto al filtraggio eseguito con i quattro filtri morfologici citati.

Filtrando lo spot di Figura 5 in successione con i filtri morfologici di Figura 4, si ottengono rispettivamente gli spot delle Figure da 6 a 9. Gli spot filtrati con i quattro filtri morfologici, come quello rappresentato in Figura 9, costituiscono la cosiddetta immagine ‘marker’ dello sfondo.

Successivamente si effettua un’operazione di ricostruzione (*Reconstruction*) sull’immagine ‘marker’ ottenendo un’immagine ricostruita di sfondo costituita da spot come quello di Figura 10. Infine si esegue un’operazione *top-hat* con l’immagine originaria e l’immagine ricostruita di sfondo, ottenendo un’immagine filtrata della luminosità dello sfondo costituita da spot come quello di Figura 11, corrispondente allo spot di Figura 5, in cui l’intensità dello sfondo è stata praticamente annullata.

Infine viene generata la rispettiva mappa binaria mediante un’operazione di *thresholding*, che sostanzialmente consiste nel confrontare con una soglia prestabilita la mappa dei livelli dell’immagine ottenuta con l’operazione di *top-hat*: se il livello di grigio di un pixel eccede la soglia prestabilita, viene generato un corrispondente pixel della mappa binaria avente un valore logico attivo (1), altrimenti viene generato un pixel della mappa binaria con valore logico nullo (0).

A causa di effetti di bordo, ma anche poiché spesso vengono eliminati completamente pixel connessi appartenenti al background o ad elementi di rumore, l’operazione di *reconstruction* non permette di ottenere perfettamente l’immagine dello sfondo degli spot. L’operazione *top-hat* fornisce quindi un’immagine in toni di grigio in cui oltre ad avere gli spot è



22 NOV. 2002



presente anche un rumore impulsivo. Di conseguenza, anche la mappa binaria sarà corrotta da rumore.

La distribuzione del rumore impulsivo che corrompe la mappa binaria è tale da consentirne una facile rimozione impiegando due operazioni di *erosion*, con elemento strutturante costituito da due maschere circolari di raggio diverso.

Per motivi che saranno più evidenti in seguito, risulta desiderabile ottenere una mappa binaria che consenta di delimitare insieme allo spot luminoso, anche un suo intorno di ampiezza sufficiente a calcolare con una certa affidabilità il valore locale di sfondo. A tale scopo, secondo una forma di realizzazione del metodo dell'invenzione si effettua un'operazione di *dilation* mediante una maschera circolare di diametro superiore al diametro dello spot. Questa operazione di *dilation* consente di compensare gli effetti indesiderati delle operazioni di *erosion*, che sostanzialmente consistono nel restringimento (sulla mappa binaria) della zona dello spot luminoso che non contiene solo pixel di sfondo o di rumore.

Un diagramma di flusso che riassume gli step di processo di un'operazione di localizzazione (array localization) secondo il metodo di analisi dell'invenzione, è mostrato in Figura 12.

Convenientemente, l'operazione di localizzazione (array localization) sarà eseguita da un sistema di array localization organizzato secondo un'architettura di rete neurale cellulare del tipo divulgato in [1].

L'immagine ottenuta con il processo di array localization è una mappa logica binaria, esemplificata in Figura 13, contenente la sagoma di ogni spot.

---

[1] EP 1 182 602 di Arena P. et al., a nome della stessa richiedente.

22 NOV. 2002



I pixel in nero hanno valore logico attivo (1) ed indicano la presenza di uno spot, mentre i pixel in bianco hanno valore logico nullo (0) e corrispondono a pixel di sfondo o di rumore.

Al fine di estrarre gli spot è possibile usare un qualsiasi algoritmo noto di identificazione di cluster (clustering) da immagini basato su proprietà dei pixels.

Un algoritmo di identificazione di cluster particolarmente adatto allo scopo è l'algoritmo divulgato in [2], implementato utilizzando la distanza euclidea come metrica e un criterio a soglia (clustering condition) per individuare pixel di uno stesso cluster.

Questo algoritmo, che verrà descritto in seguito, può essere applicato anche per eseguire operazioni diverse da quella di estrazione di spot. Esso è molto conveniente perché funziona qualunque sia il predicato specificato dall'utente per distinguere pixel di segnale da pixel di sfondo, senza che la successione degli step di processo sia modificata. Inoltre esso permette di utilizzare predicati basati su "soft computing" e ha il vantaggio di non richiedere l'intervento dell'utente. Infine esso non richiede alcuna condizione iniziale (seme dell'algoritmo), a differenza di tanti altri algoritmi che producono risultati diversi a seconda del seme inizialmente scelto.

Un diagramma di flusso generale dell'algoritmo di identificazione citato, utilizzato per eseguire l'operazione di estrazione del metodo di analisi di immagini dell'invenzione, è rappresentato in Figura 14.

Il primo passo GENERAL CLUSTERING consiste nello scandire per colonna (o per riga) i pixel dell'immagine filtrata, raggruppando in cluster

[2] Alessi Enrico, Coco Salvatore, Pappalardo Giuseppe, Capizzi Giacomo, "A NEW CLUSTERING BASED SYSTEM FOR AUTOMATED OBJECT RECOGNITION" - SOCO '98. – Università di Catania.



22 NOV. 2002

elementari i pixel di una stessa colonna (riga) scanditi consecutivamente, cioè pixel adiacenti della stessa colonna (riga), che soddisfano un criterio prestabilito. Ciascun cluster elementare è definito da un numero identificativo INDEX, da un numero di colonna  $y$  (riga) e da coordinate minima  $x_{\min}$  e massima  $x_{\max}$  del cluster sulla colonna (riga)  $y$ .

Il criterio particolare usato per eseguire l'operazione di estrazione di spot (spot extraction), consiste nel raggruppare in uno stesso cluster elementare pixel scanditi consecutivamente che appartengano alla stessa colonna (riga) e che corrispondano a pixel della mappa binaria aventi lo stesso valore logico.

Per meglio comprendere il funzionamento dell'algoritmo, se ne darà una breve descrizione generale facendo riferimento alle Figure da 15 a 20.

La Figura 15 mostra colonne di pixel di un'immagine già raggruppati in cluster elementari in seguito all'operazione di GENERAL CLUSTERING eseguita con un certo criterio. Ad esempio, questo criterio potrebbe essere determinato da un predicato basato su "soft computing", oppure potrebbe essere un criterio basato su soglia. Il numero identificativo dei cluster elementari è riportato a sinistra di ciascun cluster.

I pixel di uno stesso cluster elementare sono rappresentati come pixel di un'immagine binaria aventi valore logico attivo (1), mentre i pixel di sfondo o di rumore sono rappresentati come pixel aventi valore logico nullo (0).

I cluster elementari sono processati con una prima operazione di fusione MERGE1, effettuata in due passi: prima si individua, per ogni cluster elementare  $c$  in una certa colonna (riga), un insieme di cluster elementari  $S$  nella colonna (riga) immediatamente precedente che confinano con tale



22 NOV. 2002

cluster elementare; poi in questo insieme  $S$  si identifica un cluster "vincitore"  $w$  che ha il maggior numero di pixel di confine con il cluster  $c$  e si uguaglia il suo numero identificativo con quello del cluster  $c$ . Il risultato dell'operazione MERGE1 sull'immagine binaria di Figura 15 è mostrato in Figura 16.

I cluster dell'insieme  $S$  diversi dal cluster vincitore vengono individuati come cluster "perdenti" e ad essi è assegnata una rispettiva tripla comprendente il loro numero identificativo, il numero identificativo del rispettivo cluster vincitore e il numero di colonna cui appartengono (BOUND REPORTING, REPORT PROCESSING).

I numeri identificativi dei cluster perdenti vengono cambiati nei numeri identificativi dei rispettivi cluster vincitori mediante l'operazione MERGE2, il cui risultato è mostrato in Figura 17. A questo punto i cluster elementari appartenenti ad uno stesso oggetto sono individuati da uno stesso numero identificativo.

Per comodità si possono assegnare ai diversi oggetti rappresentati numeri identificativi consecutivi con l'operazione di CLUSTER SORTING, come mostrato in Figura 18.

Infine con l'operazione CLUSTER EXTRACTION, si estraggono dall'immagine originaria di Figura 19, associata all'immagine binaria di Figura 15, i pixel corrispondenti a cluster elementari aventi lo stesso numero identificativo, isolando così i singoli oggetti rappresentati, come mostrato in Figura 20.

Applicando l'algoritmo appena descritto ad una mappa binaria ottenuta mediante l'operazione di array localization e alla relativa immagine filtrata, i singoli spot luminosi sono isolati senza l'intervento dell'operatore, come





22 NOV. 2002

descritto dalle Figure da 21 a 25. In Figura 21 è mostrata in forma stilizzata una mappa binaria. La Figura 22 mostra il risultato dell'operazione MERGE1 (l'operazione MERGE2 nel caso di Figura 21 non cambia nulla) e la Figura 23 il risultato dell'operazione di CLUSTER SORTING. Le Figure 24 e 25, analogamente alle Figure 19 e 20, illustrano l'estrazione degli spot luminosi dall'immagine rilevata da microarray.

Un possibile sistema di estrazione (spot extraction) di spot luminosi su uno sfondo di immagini rilevate da micro-array è mostrato in Figura 26. Esso comprende un sottosistema di scansione EXTRACTOR di pixel di un'immagine, un sottosistema di determinazione (FEATURES EXTRACTION, CLUSTERING CONDITION) di cluster elementari e un sottosistema di elaborazione CLUSTERING. Il blocco circuitale FEATURES EXTRACTION ricava dai pixel scanditi il rispettivo livello di grigio e fornisce questa informazione al blocco in cascata CLUSTERING CONDITION, che raggruppa i pixel in cluster elementari. Infine il sottosistema di elaborazione CLUSTERING dei cluster elementari produce in uscita pixels di cluster CLUSTER 1, ..., CLUSTER N rappresentanti gli spot luminosi secondo l'operazione di estrazione prima descritta.

Gli spot luminosi così isolati dall'immagine vengono processati singolarmente con l'operazione di segmentazione (intra-spot segmentation), al fine di individuare oggetti in essi rappresentati.

L'operazione di segmentazione sostanzialmente consiste nell'individuare pixel appartenenti ad uno stesso oggetto usando un criterio di similitudine tra pixel. Teoricamente è possibile utilizzare differenti criteri di similitudine basati sull'intensità del pixel e su diverse proprietà dell'intorno

22 NOV. 2002

stesso del pixel. Ovviamente la scelta del criterio deve essere effettuata considerando il problema specifico da risolvere.

Se, per esempio, si volessero estrarre tutti gli oggetti di una immagine costituiti dai contorni degli oggetti rappresentati nell'immagine stessa e se l'immagine fosse priva di rumore, si potrebbe basare il criterio solamente sul valore del gradiente di una finestra di dimensione 3x3 o 5x5 attorno al pixel considerato. Nel caso in cui l'immagine è corrotta da rumore, non basta applicare un predicato semplice come quello appena menzionato ma bisogna utilizzare dei criteri basati su diverse proprietà, molto più onerosi dal punto di vista computazionale.

Il ragionamento umano per l'individuazione di un oggetto all'interno di un'immagine è molto complesso, basato su molteplici parametri e a volte difficilmente definibile dal punto di vista matematico. Proprio per questo motivo, per risolvere i problemi più complessi di identificazione vengono utilizzati criteri definiti da predicati basati su soft computing, in alternativa ai criteri definiti da predicati a soglia.

In particolare si può usare un predicato neurale di tipo MLP (Multi layer perceptron) ed un altro basato sulla logica fuzzy. Entrambi i predicati permettono di superare i problemi che si pongono in situazioni che richiederebbero criteri difficilmente definibili matematicamente; inoltre permettono una decisione multicriterio e conferiscono al sistema stesso robustezza qualora si vogliano individuare oggetti in immagini corrotte da rumore relativamente elevato.

Secondo un altro aspetto innovativo della presente invenzione, l'operazione di segmentazione (intra-spot segmentation) viene effettuata



22 NOV. 2002

mediante un algoritmo fuzzy, che può essere definito da regole linguistiche determinate direttamente da un esperto oppure definito a partire da un file di learning che contiene i pattern delle proprietà e le corrispondenti uscite in relazione al problema da risolvere.

La sagoma dello spot della mappa binaria ottenuta con l'operazione di array localization è più grande di quella dello spot reale, in modo da selezionare con lo spot anche la zona circostante di sfondo (background). Il tono (livello di grigio) dello sfondo nelle zone limitrofe dello spot isolato serve per il calcolo di un fattore di normalizzazione e pertanto deve essere determinato con precisione.

Questo fattore di normalizzazione è importante perché i livelli di grigio di immagini ottenute quando si analizzano campioni di DNA dipendono anche dal tipo di colorante usato per evidenziare l'ibridazione. Per poter confrontare (matching) quindi immagini ottenute con coloranti diversi, i toni degli spot luminosi devono essere prima normalizzati rispetto al tono dello sfondo. Con altrettanta cura deve essere determinato il tono di ciascun pixel soprattutto in presenza di spot facilmente confondibili con lo sfondo (background) locale.

È importante ricordare che pixel di background possono trovarsi annidati anche all'interno dello spot. Questo fa sì che i criteri da utilizzare per distinguere pixel di segnale da pixel di sfondo all'interno di uno spot in genere sono complicati o difficilmente formalizzabili. Per ovviare a questa difficoltà è stato ideato un criterio fuzzy per distinguere pixel di segnale da pixel di sfondo o di rumore all'interno di uno spot luminoso. Secondo tale criterio fuzzy, si scandiscono pixel di uno spot e si calcola un valore



22 NOV. 2002

caratteristico per ogni pixel scandito: se tale valore caratteristico eccede una soglia prestabilita, allora il pixel viene giudicato come appartenente ad un oggetto (cluster) rappresentato nello spot.

La scelta degli antecedenti impiegati nell'algoritmo fuzzy è stata effettuata dopo aver studiato l'istogramma dei livelli di grigio degli spot.

È stato notato che ogni spot ha un istogramma normalmente trimodale o bimodale a seconda che esso è o non è corrotto da rumore. In particolare mentre il primo e il secondo modo corrispondono rispettivamente al background e al segnale, il terzo modo è relativo al rumore. Sono così stati scelti i seguenti 3 antecedenti per un algoritmo fuzzy:

1. il tono del singolo pixel;
2. la distanza ( $\delta$ ) del livello di grigio del pixel considerato dal valor medio del tono di pixel sfondo;
3. il quadrato di questa distanza ( $\delta^2$ ).

Le regole, la forma ed il posizionamento delle funzioni membro (membership functions) sono state generate automaticamente servendosi di una rete neurale.

Preferibilmente, ma non obbligatoriamente, all'interno dello spot sono identificate preliminarmente due zone: la zona *True signal* contenente pixel di segnale e la zona *False signal* contenente pixel di rumore o di sfondo. Per la separazione dei pixel dello spot in una zona contenente di pixel di segnale ed in una zona contenente di pixel di sfondo è utilizzato l'algoritmo fuzzy con i 3 antecedenti sopra citati, ciascun antecedente avente 3 funzioni membro (membership functions).

Per l'apprendimento (learning) di un sistema fuzzy destinato ad





**22 NOV. 2002**

implementare l'algoritmo, sono stati individuati gli spot più rappresentativi della maggior parte dei casi che si possono verificare. Ad ogni pattern è associato un valore logico 1 o 0 a seconda che il pixel considerato sia un pixel di segnale o di sfondo.

In Figura 27 è mostrato un diagramma di simulazione dell'algoritmo fuzzy in corrispondenza dei pattern di allenamento corrispondenti a due spot con livelli di grigio completamente differenti. Le Figure da 28 a 30 mostrano le funzioni membro delle variabili di ingresso dell'algoritmo fuzzy rispettivamente del tono di grigio, della distanza  $\delta$  e della distanza al quadrato  $\delta^2$ . I conseguenti dell'algoritmo fuzzy sono riportati in Figura 31.

Maggiori dettagli sul predicato fuzzy dell'algoritmo di segmentazione (intra-spot segmentation) sono esposti nel seguente rapporto:

**SISTEMA FUZZY CON FUNZIONI MEMBRO GAUSSIANE**

Formula della funzione membro (shape):  $y = \exp\left(-\frac{(x - m)^2}{2s^2}\right)$

in cui:

$x$  è il valore d'ingresso;

$m$  è la media;

$s$  è la varianza.

Nel seguito sarà indicata con  $\text{GAUSS}(x, m, s)$ .

**\*\*\* Variabili d'ingresso \*\*\***

Variabile d'ingresso 1: tono

Fuzzy Set Name: Centroid:

SET1\_1 25.182846

Shape:  $\text{GAUSS}(x_1, 25.182846, 9.731716)$

Fuzzy Set Name: Centroid:

SET1\_2 22.915066

Shape:  $\text{GAUSS}(x_1, 22.915066, 1.789337)$

Fuzzy Set Name: Centroid:

SET1\_3 62.334343

Shape:  $\text{GAUSS}(x_1, 62.334343, 30.384819)$

Variabile d'ingresso 2: distanza

Fuzzy Set Name: Centroid:

SET2\_1 1.411060

22 NOV. 2002



Shape: GAUSS( $x_2$ , 1.411060, 1.927289)  
 Fuzzy Set Name: Centroid:  
 SET2\_2 11.101624  
 Shape: GAUSS( $x_2$ , 11.101624, 7.363041)  
 Fuzzy Set Name: Centroid:  
 SET2\_3 7.316561  
 Shape: GAUSS( $x_2$ , 7.316561, 31.509554)

Variabile d'ingresso 3: distanza al quadrato  
 Fuzzy Set Name: Centroid:  
 SET3\_1 88.555168  
 Shape: GAUSS( $x_3$ , 88.555168, 1090.161377)  
 Fuzzy Set Name: Centroid:  
 SET3\_2 1176.142700  
 Shape: GAUSS( $x_3$ , 1176.142700, 310.110229)  
 Fuzzy Set Name: Centroid:  
 SET3\_3 1488.746460  
 Shape: GAUSS( $x_3$ , 1488.746460, 308.677734)

\*\*\* Variabili di uscita \*\*\*

Variabile di uscita 1: CONS1  
 Fuzzy Set Names: Centroids:  
 CONS1\_1 0.006696  
 CONS1\_17 -0.413813  
 CONS1\_21 1.986579  
 CONS1\_63 1.001855  
 CONS1\_64 0.999214

Il criterio fuzzy appena descritto può convenientemente essere utilizzato per eseguire lo step GENERAL CLUSTERING dell'algoritmo di indentificazione divulgato in [2] per eseguire l'operazione di segmentazione. Secondo un'implementazione preferita del metodo di analisi di immagini dell'invenzione, l'operazione di segmentazione è eseguita effettuando i passi di processo schematizzati in Figura 14 utilizzando però questo criterio fuzzy invece del criterio basato su soglia, che è stato usato per estrarre i singoli spot.

Ovviamente, un sistema per eseguire l'operazione di segmentazione (intra-spot segmentation) sarà come quello riportato in Figura 26 e descritto

22 NOV. 2002



con riferimento all'operazione di estrazione di spot. In questo caso però il blocco FEATURES EXTRACTION ricava per ogni pixel scandito i rispettivi tre antecedenti del criterio fuzzy (tono,  $\delta$ ,  $\delta^2$ ), e fornisce questa informazione al blocco CLUSTERING CONDITION, il quale raggruppa i pixel in cluster elementari usando il criterio fuzzy. Il blocco CLUSTERING esegue nel modo già descritto gli altri passi dell'algoritmo.

I cluster di uscita CLUSTER 1, ..., CLUSTER N rappresentano in questo caso oggetti (costituiti da pixel di segnale) rappresentati nello spot esaminato.

Una volta completata l'operazione di segmentazione (intra-spot segmentation), ogni singolo spot del micro-array viene infine esaminato per ottenere dei parametri caratteristici e indici di qualità. Questi parametri permettono di caratterizzare uno spot ed eventualmente di effettuare anche un'analisi comparativa tra le immagini ottenute usando i coloranti Cy3 e Cy5 per evidenziare l'ibridazione in campioni di DNA.

La seguente tabella illustra alcuni parametri utili per caratterizzare uno spot e il modo in cui essi sono calcolati, facendo riferimento alla figura citata.

Parametro	Significato
Centro dello spot	Coordinate del baricentro dello spot Figura 32
Media del segnale	Media dei livelli di grigio dei pixel dello spot appartenenti alla classe <i>True signal</i> Figura 33
Media del background	Media dei livelli di grigio dei pixel dello spot appartenenti al perimetro della shape Figura 34
Mediana del segnale	Mediana dei livelli di grigio dei pixel dello spot appartenenti classe <i>True signal</i> Figura 35
Mediana del background	Mediana dei livelli di grigio dei pixel dello spot appartenenti al perimetro della shape Figura 36
FOMV	Media dell'uscita del sistema fuzzy per i pixel



**22 NOV. 2002**

	assegnati alla classe <i>True signal</i> .
Fattore di simmetria	Rapporto tra altezza e larghezza del minimo rettangolo che include lo spot Figura 37
Area dello spot	Numero di pixel dello spot Figura 38
Area del background	Numero di pixel del perimetro della shape Figura 39
Area del segnale	Numero di pixel appartenenti alla classe <i>True signal</i> Figura 40
Fattore di correzione	Differenza tra la mediana del livello di grigio dei pixel del segnale e la mediana del livello di grigio dei pixel del background

Un parametro importante per la valutazione della qualità dello spot estratto è quello indicato con la sigla FOMV, dato dalla media dell'uscita fuzzy per pixel di segnale, che è un indice della qualità della selezione dei pixel di segnale dai pixel di sfondo.

Quanto più l'uscita fuzzy si approssima ad 1, tanto più si può considerare affidabile l'individuazione di un pixel come pixel di segnale e non di sfondo. Facendo una media dell'uscita fuzzy, si ottiene quindi un indice della qualità della selezione dei pixel di segnale tra i pixel di sfondo.

#### METODO DI IDENTIFICAZIONE DI PIXEL APPARTENENTI AD UNO STESSO CLUSTER

Un ulteriore oggetto della presente invenzione è un metodo di identificazione di pixel di un'immagine appartenenti ad uno stesso cluster.

Tutti i metodi di identificazione di pixel di uno stesso oggetto rappresentato si basano su un criterio di similitudine tra pixel. È possibile utilizzare differenti criteri di similitudine basati sull'intensità del pixel e su diverse proprietà dell'intorno stesso del pixel. Ovviamente la scelta del criterio deve essere effettuata considerando il problema specifico da risolvere.



22 NOV. 2002



Se, per esempio, si vogliono identificare gli oggetti di una immagine aventi contorni definiti e se l'immagine fosse priva di rumore, il criterio di similitudine potrebbe essere basato solamente sul valore del gradiente di una finestra di dimensione 3x3 o 5x5 attorno al pixel considerato. Nel caso in cui l'immagine è corrotta da rumore, non basta applicare un predicato semplice come quello appena menzionato ma bisogna utilizzare altri criteri molto più onerosi dal punto di vista computazionale.

Il ragionamento umano per l'individuazione di un oggetto all'interno di un'immagine è molto complesso, basato su molteplici parametri e a volte è difficilmente definibile dal punto di vista matematico. Proprio per questo motivo, per risolvere i problemi più complessi di identificazione, vengono utilizzati criteri definiti da prediciati basati su soft computing, in alternativa ai criteri definiti da prediciati a soglia.

In particolare si può usare un predicato neurale di tipo MLP (Multi layer perceptron) ed un altro basato su un algoritmo fuzzy, che può essere definito da regole linguistiche determinate direttamente da un esperto oppure definito a partire da un file di learning che contiene i pattern delle proprietà e le corrispondenti uscite in relazione al problema da risolvere. Entrambi i prediciati permettono di superare i problemi che si pongono in situazioni che richiederebbero criteri difficilmente definibili matematicamente; inoltre permettono una decisione multicriterio e conferiscono al sistema stesso robustezza qualora si vogliano individuare oggetti in immagini corrotte da rumore relativamente elevato.

Il metodo di identificazione dell'invenzione si basa su un criterio fuzzy per distinguere pixel di un oggetto da identificare da pixel di sfondo o di

22 NOV. 2002



rumore. Uno scopo dell'invenzione è quello di fornire un metodo di identificazione di pixel appartenenti ad uno stesso oggetto che possa essere usato per eseguire l'operazione di segmentazione (intra-spot segmentation) di spot luminosi su uno sfondo all'interno di un metodo di analisi di immagini rilevate da micro-array.

Secondo tale metodo dell'invenzione, si scandiscono pixel di immagine e si calcola con un algoritmo fuzzy un valore caratteristico per ogni pixel scandito: se tale valore caratteristico eccede una soglia prestabilita, allora il pixel viene giudicato come appartenente ad un oggetto (cluster) rappresentato.

La scelta degli antecedenti impiegati nell'algoritmo fuzzy è stata effettuata dopo aver studiato l'istogramma dei livelli di grigio di tipici spot luminosi di immagini che si ottengono nello studio del DNA.

È stato notato che ogni spot ha un istogramma normalmente trimodale o bimodale a seconda che esso è o non è corrotto da rumore. In particolare mentre il primo e il secondo modo corrispondono rispettivamente al background e al segnale, il terzo modo è relativo al rumore. Sono così stati scelti i seguenti 3 antecedenti per un algoritmo fuzzy:

1. il tono del singolo pixel;
2. la distanza ( $\delta$ ) del livello di grigio del pixel considerato dal valor medio del tono di pixel sfondo;
3. il quadrato di questa distanza ( $\delta^2$ ).

Sostanzialmente, il metodo dell'invenzione consiste nello scandire pixel dell'immagine, calcolare un valore caratteristico per ciascun pixel con un algoritmo fuzzy i cui antecedenti sono

22 NOV. 2002

- il tono di un pixel,
- la distanza tra detto tono e il valore medio del tono dei rispettivi pixel di sfondo,
- il quadrato di detta distanza;

e contemplante le operazioni di calcolare il valore medio del tono di pixel di sfondo, giudicando i pixel scanditi come appartenenti ad uno stesso oggetto se il rispettivo valore caratteristico eccede una soglia prestabilita.

Preferibilmente, ciascun antecedente ha tre funzioni membro (membership functions), ciascuna di esse essendo una funzione gaussiana con media e varianza predeterminate.

Le Figure da 28 a 30 mostrano alcune funzioni membro delle variabili di ingresso dell'algoritmo fuzzy rispettivamente del tono di grigio, della distanza  $\delta$  e della distanza al quadrato  $\delta^2$ . I conseguenti dell'algoritmo fuzzy sono riportati in Figura 31. Maggiori dettagli sul criterio fuzzy descritto facendo riferimento alle Figure da 28 a 31 sono esposti nel seguente rapporto:

**SISTEMA FUZZY CON FUNZIONI MEMBRO GAUSSIANE**

Formula della funzione membro (shape):  $y = \exp\left(-\frac{(x - m)^2}{2s^2}\right)$

in cui:

$x$  è il valore d'ingresso;

$m$  è la media;

$s$  è la varianza.

Nel seguito sarà indicata con  $GAUSS(x, m, s)$ .

**\*\*\* Variabili d'ingresso \*\*\***

Variabile d'ingresso 1: tono

Fuzzy Set Name: Centroid:

SET1\_1 25.182846

Shape:  $GAUSS(x_1, 25.182846, 9.731716)$

Fuzzy Set Name: Centroid:

SET1\_2 22.915066

Shape:  $GAUSS(x_1, 22.915066, 1.789337)$

Fuzzy Set Name: Centroid:

22 NOV. 2002



SET1\_3 62.334343

Shape: GAUSS( $x_1$ , 62.334343, 30.384819)

Variabile d'ingresso 2: distanza

Fuzzy Set Name: Centroid:

SET2\_1 1.411060

Shape: GAUSS( $x_2$ , 1.411060, 1.927289)

Fuzzy Set Name: Centroid:

SET2\_2 11.101624

Shape: GAUSS( $x_2$ , 11.101624, 7.363041)

Fuzzy Set Name: Centroid:

SET2\_3 7.316561

Shape: GAUSS( $x_2$ , 7.316561, 31.509554)

Variabile d'ingresso 3: distanza al quadrato

Fuzzy Set Name: Centroid:

SET3\_1 88.555168

Shape: GAUSS( $x_3$ , 88.555168, 1090.161377)

Fuzzy Set Name: Centroid:

SET3\_2 1176.142700

Shape: GAUSS( $x_3$ , 1176.142700, 310.110229)

Fuzzy Set Name: Centroid:

SET3\_3 1488.746460

Shape: GAUSS( $x_3$ , 1488.746460, 308.677734)

## \*\*\* Variabili di uscita \*\*\*

Variabile di uscita 1: CONS1

Fuzzy Set Names: Centroids:

CONS1\_1 0.006696

CONS1\_17 -0.413813

CONS1\_21 1.986579

CONS1\_63 1.001855

CONS1\_64 0.999214

Secondo una forma preferita di realizzazione della presente invenzione, il criterio fuzzy appena descritto può essere convenientemente utilizzato nell'algoritmo di estrazione divulgato in [2] per estrarre pixel di oggetti rappresentati in un'immagine. Un diagramma di flusso di questa realizzazione preferita dell'algoritmo di identificazione dell'invenzione è rappresentato in Figura 14.

Il primo passo GENERAL CLUSTERING consiste nello scandire per





22 NOV. 2002

colonna (o per riga) i pixel dell'immagine filtrata, raggruppando in cluster elementari i pixel di una stessa colonna (riga) scanditi consecutivamente, cioè pixel adiacenti della stessa colonna (riga), che secondo il criterio fuzzy descritto sono giudicati come appartenenti ad uno stesso oggetto. Ciascun cluster elementare è definito da un numero identificativo INDEX, da un numero di colonna  $y$  (riga) e da coordinate minima  $x_{\min}$  e massima  $x_{\max}$  del cluster sulla colonna (riga)  $y$ .

Per meglio comprendere questa realizzazione del metodo di identificazione dell'invenzione, si faccia riferimento alle Figure da 15 a 20.

La Figura 15 mostra colonne di pixel di un'immagine già raggruppati in cluster elementari in seguito al passo di processo di GENERAL CLUSTERING. Il numero identificativo dei cluster elementari è riportato a sinistra di ciascun cluster.

I pixel di uno stesso cluster elementare sono rappresentati come pixel di un'immagine binaria aventi valore logico attivo (1), mentre i pixel di sfondo o di rumore sono rappresentati come pixel aventi valore logico nullo (0).

I cluster elementari sono processati con una prima operazione di fusione MERGE1, effettuata in due passi: prima si individua, per ogni cluster elementare  $c$  in una certa colonna (riga), un insieme di cluster elementari  $S$  nella colonna (riga) immediatamente precedente che confinano con tale cluster elementare; poi in questo insieme  $S$  si identifica un cluster "vincitore"  $w$  che ha il maggior numero di pixel di confine con il cluster  $c$  e si uguaglia il suo numero identificativo con quello del cluster  $c$ . Il risultato dell'operazione MERGE1 sull'immagine binaria di Figura 15 è mostrato in Figura 16.

I cluster dell'insieme  $S$  diversi dal cluster vincitore vengono individuati

22 NOV. 2002



come cluster "perdenti" e ad essi è assegnata una rispettiva tripla comprendente il loro numero identificativo, il numero identificativo del rispettivo cluster vincitore e il numero di colonna cui appartengono (BOUND REPORTING, REPORT PROCESSING).

I numeri identificativi dei cluster perdenti vengono cambiati nei numeri identificativi dei rispettivi cluster vincitori mediante l'operazione MERGE2, il cui risultato è mostrato in Figura 17. A questo punto i cluster elementari appartenenti ad uno stesso oggetto sono individuati da uno stesso numero identificativo.

Per comodità si possono assegnare ai diversi oggetti rappresentati numeri identificativi consecutivi con l'operazione di CLUSTER SORTING, come mostrato in Figura 18.

Infine con l'operazione CLUSTER EXTRACTION, si estraggono dall'immagine originaria di Figura 19, associata all'immagine binaria di Figura 15, i pixel corrispondenti a cluster elementari aventi lo stesso numero identificativo, isolando così i singoli oggetti rappresentati, come mostrato in Figura 20.

Un possibile sistema di identificazione implementante il metodo descritto è mostrato in Figura 26. Esso comprende un sottosistema di scansione EXTRACTOR di pixel di un'immagine, un sottosistema di determinazione (FEATURES EXTRACTION, CLUSTERING CONDITION) di cluster elementari e un sottosistema di elaborazione CLUSTERING. Il blocco circuitale FEATURES EXTRACTION ricava dai pixel scanditi i ripetuti tre antecedenti del criterio fuzzy (tono,  $\delta$ ,  $\delta^2$ ), e fornisce questa informazione al blocco in cascata CLUSTERING CONDITION, che raggruppa i pixel in cluster elementari

22 NOV. 2002

applicando il criterio fuzzy. Infine il sottosistema di elaborazione CLUSTERING dei cluster elementari produce in uscita pixels di oggetti rappresentati CLUSTER 1, ..., CLUSTER N.

Il metodo di identificazione dell'invenzione può essere convenientemente utilizzato per eseguire l'operazione di segmentazione (intra-spot segmentation) di spot di immagini rilevate da micro-array. Questa operazione consiste nel distinguere pixel di oggetti rappresentati in uno spot luminoso da pixel di sfondo o di rumore.

Preferibilmente, ma non obbligatoriamente, all'interno dello spot sono identificate preliminarmente due zone: la zona *True signal* contenente pixel di segnale e la zona *False signal* contenente pixel di rumore o di sfondo. Per la separazione dei pixel dello spot in una zona contenente di pixel di segnale ed in una zona contenente di pixel di sfondo è utilizzato l'algoritmo fuzzy con i 3 antecedenti sopra citati, ciascun antecedente avente 3 funzioni membro (membership functions).

Per l'apprendimento (learning) di un sistema fuzzy destinato ad implementare l'algoritmo, sono stati individuati gli spot più rappresentativi della maggior parte dei casi che si possono verificare. Ad ogni pattern è associato un valore logico 1 o 0 a seconda che il pixel considerato sia un pixel di segnale o di sfondo.

In Figura 27 è mostrato un diagramma di simulazione dell'algoritmo fuzzy in corrispondenza dei pattern di allenamento corrispondenti a due spot con livelli di grigio completamente differenti.

Una volta completata l'operazione di segmentazione (intra-spot segmentation), ogni singolo spot del micro-array viene infine esaminato per



22 NOV. 2002

ottenere dei parametri caratteristici e indici di qualità. Questi parametri permettono di caratterizzare uno spot ed eventualmente di effettuare anche un'analisi comparativa tra le immagini ottenute usando i coloranti Cy3 e Cy5 per evidenziare l'ibridazione in campioni di DNA.

La seguente tabella illustra alcuni parametri utili per caratterizzare uno spot e il modo in cui essi sono calcolati, facendo riferimento alla figura citata.

Parametro	Significato
Centro dello spot	Coordinate del baricentro dello spot Figura 32
Media del segnale	Media dei livelli di grigio dei pixel dello spot appartenenti alla classe <i>True signal</i> Figura 33
Media del background	Media dei livelli di grigio dei pixel dello spot appartenenti al perimetro della shape Figura 34
Mediana del segnale	Mediana dei livelli di grigio dei pixel dello spot appartenenti classe <i>True signal</i> Figura 35
Mediana del background	Mediana dei livelli di grigio dei pixel dello spot appartenenti al perimetro della shape Figura 36
FOMV	Media dell'uscita del sistema fuzzy per i pixel assegnati alla classe <i>True signal</i> .
Fattore di simmetria	Rapporto tra altezza e larghezza del minimo rettangolo che include lo spot Figura 37
Area dello spot	Numero di pixel dello spot Figura 38
Area del background	Numero di pixel del perimetro della shape Figura 39
Area del segnale	Numero di pixel appartenenti alla classe <i>True signal</i> Figura 40
Fattore di correzione	Differenza tra la mediana del livello di grigio dei pixel del segnale e la mediana del livello di grigio dei pixel del background

Un parametro importante per la valutazione della qualità della selezione dei pixel estratti è quello indicato con la sigla FOMV, dato dalla media

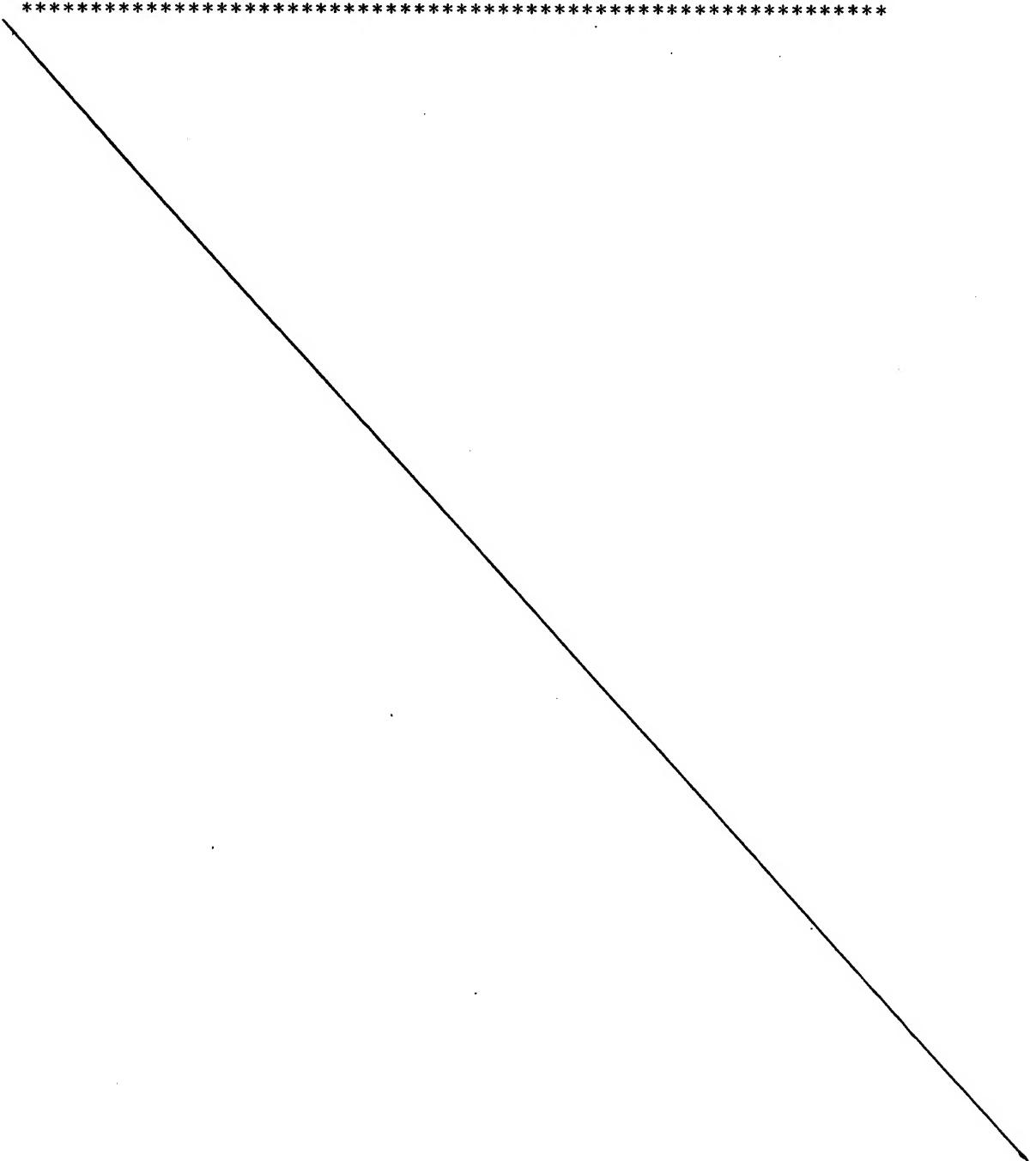


**22 NOV. 2002**



dell'uscita fuzzy per pixel di segnale. Quanto più l'uscita fuzzy si approssima ad 1, tanto più si può considerare affidabile l'individuazione di un pixel come pixel appartenente ad un oggetto rappresentato (pixel di segnale) e non come un pixel di sfondo. Facendo una media dell'uscita fuzzy, si ottiene quindi un indice della qualità della selezione dei pixel di segnale tra i pixel di sfondo.

\*\*\*\*\*



22 NOV. 2002

RIVENDICAZIONI

1. Metodo di analisi di immagini rilevate da un micro-array sotto forma di uno o più spot luminosi su uno sfondo, comprendente le seguenti operazioni:

determinare forme e relative posizioni di detti spot sull'area sensibile di detto micro-array (array localization) generando una mappa binaria di pixels definente confini di detti spot luminosi su detto sfondo,

isolare ciascuno di detti spot mediante un'operazione di estrazione (spot extraction) usando detta mappa binaria,

esaminare ciascuno spot mediante un'operazione di segmentazione (intra-spot segmentation) identificando con un criterio prestabilito pixel appartenenti ad uno stesso cluster,

per ciascuno di detti spot, determinare relativi parametri caratteristici ed indici di qualità,

caratterizzato dal fatto che detta mappa binaria è generata con una tecnica di filtraggio morfologico comprendente le operazioni di:

filtrare un'immagine rilevata da microarray con almeno un filtro morfologico generando una corrispondente immagine 'marker' dello sfondo (background);

ricostruire detto sfondo (background) effettuando un'operazione di ricostruzione (reconstruction) su detta immagine 'marker', generando una corrispondente immagine ricostruita di sfondo;

generare un'immagine filtrata della luminosità dello sfondo effettuando un'operazione top-hat su detta immagine ricostruita e detta immagine rilevata da microarray;



22 NOV. 2002

generare detta mappa binaria mediante un'operazione di thresholding su detta immagine filtrata della luminosità dello sfondo.

2. Il metodo della rivendicazione 1, in cui detta operazione di ricostruzione (reconstruction) è eseguita stabilendo preliminarmente che gli spot hanno forma circolare.

3. Il metodo della rivendicazione 1, comprendente inoltre filtrare il rumore corrompente detta mappa binaria mediante le seguenti operazioni:

eseguire in successione due operazioni di erosion con maschere circolari di raggio diverso,

eseguire un'operazione di dilation con una maschera circolare di diametro superiore al diametro massimo degli spot, generando una mappa binaria filtrata da rumore;

utilizzare detta mappa binaria filtrata da rumore in detta operazione di estrazione (spot extraction).

4. Il metodo della rivendicazione 1, in cui gli spot di un'immagine 'marker' sono generati con le seguenti operazioni:

definire un sistema di riferimento cartesiano per gli spot dell'immagine rilevata da micro-array;

effettuare in ordine le seguenti operazioni di filtraggio morfologico di detti spot con opening direzionali impieganti come elemento strutturante (structuring set) segmenti di lunghezza non superiore ad un massimo diametro degli spot, orientati rispettivamente

lungo la bisettrice del primo e del terzo quadrante,

lungo la bisettrice del secondo e del quarto quadrante,



22 NOV. 2002

lungo l'asse delle ascisse, e

lungo l'asse delle ordinate

di detto sistema di riferimento cartesiano, generando spot di una corrispondente immagine 'marker'.

5. Il metodo della rivendicazione 1, in cui detta operazione di estrazione (spot extraction) comprende le operazioni di:

scandire (GENERAL CLUSTERING) pixel di un'immagine per colonna o per riga, associando a pixels adiacenti scanditi consecutivamente e corrispondenti a pixel della relativa mappa binaria aventi uno stesso valore logico attivo, una rispettiva quadrupla definente un cluster elementare costituita da un numero identificativo (INDEX), coordinate minima ( $x_{min}$ ) e massima ( $x_{max}$ ) e numero di colonna o di riga (y);

individuare (MERGE1) per ogni cluster elementare (INDEX=C) in una certa colonna o riga (i+1) un insieme di cluster elementari (S) nella colonna o riga immediatamente precedente (i) confinanti con detto cluster elementare (INDEX=C);

individuare in detto insieme di cluster elementari (S) un cluster "vincitore" (INDEX=W) che ha il maggior numero di pixel di confine con detto cluster elementare (INDEX=C) e cluster "perdenti" diversi da detto cluster "vincitore", porre il numero identificativo di detto cluster elementare uguale al numero identificativo di detto cluster "vincitore" (W);

porre (MERGE2) il numero identificativo di ciascuno dei cluster perdenti uguale al numero identificativo del rispettivo cluster vincitore (W);

selezionare (CLUSTER SORTING, CLUSTER EXTRACTION) pixel rappresentanti spot luminosi estraendo dall'immagine originaria pixel di



22 NOV. 2002



cluster aventi lo stesso numero identificativo.

6. Il metodo della rivendicazione 1, in cui detto criterio prestabilito dell'operazione di segmentazione (intra-spot segmentation) consiste nel calcolare un valore caratteristico per pixel di uno spot con un algoritmo fuzzy contemplante le operazioni di:

calcolare per detto spot il valore medio del tono di pixel di sfondo; detto algoritmo fuzzy avendo come antecedenti:

il tono di un pixel,

la distanza tra detto tono e il valore medio del tono dei rispettivi pixel di sfondo,

il quadrato di detta distanza;

giudicare detti pixel come appartenenti ad uno stesso cluster se detto valore caratteristico eccede una soglia prestabilita.

7. Il metodo della rivendicazione 6, comprendente le operazioni di definire con detto criterio prestabilito in ciascuno spot una prima zona (TRUE SIGNAL) contenente pixel di segnale ed una seconda zona (FALSE SIGNAL) contenente pixel di sfondo o di rumore.

8. Il metodo della rivendicazione 6, in cui ciascun antecedente ha tre funzioni membro (membership).

9. Il metodo della rivendicazione 8, in cui dette funzioni membro (membership) sono funzioni gaussiane aventi media e varianza predeterminate.

10. Il metodo della rivendicazione 6, in cui detto algoritmo fuzzy ha cinque conseguenti.

11. Il metodo della rivendicazione 6, in cui detta operazione di

22 NOV. 2002



segmentazione (intra-spot segmentation) comprende:

scandire (GENERAL CLUSTERING) pixel di un'immagine per colonna o per riga, associando a pixels adiacenti scanditi consecutivamente e soddisfacenti detto criterio prestabilito, una rispettiva quadrupla definente un cluster elementare costituita da un numero identificativo (INDEX), coordinate minima ( $x_{min}$ ) e massima ( $x_{max}$ ) e numero di colonna o di riga (y);

individuare (MERGE1) per ogni cluster elementare (INDEX=C) in una certa colonna o riga (i+1) un insieme di cluster elementari (S) nella colonna o riga immediatamente precedente (i) confinanti con detto cluster elementare (INDEX=C);

individuare in detto insieme di cluster elementari (S) un cluster "vincitore" (INDEX=W) che ha il maggior numero di pixel di confine con detto cluster elementare (INDEX=C) e cluster "perdenti" diversi da detto cluster "vincitore", porre il numero identificativo di detto cluster elementare uguale al numero identificativo di detto cluster "vincitore" (W);

porre (MERGE2) il numero identificativo di ciascuno dei cluster perdenti uguale al numero identificativo del rispettivo cluster vincitore (W);

separare (CLUSTER SORTING, CLUSTER EXTRACTION) pixel di oggetti rappresentati in detto spot da pixel di sfondo estraendo pixel di cluster aventi lo stesso numero identificativo.

12. Il metodo della rivendicazione 7, comprendente calcolare per ciascuno spot parametri caratteristici ed indici di qualità scelti nell'insieme composto da:

- il valore medio del tono dei pixel di segnale di detta prima zona (TRUE SIGNAL);

22 NOV. 2002



- le coordinate del baricentro dello spot;
- il valore medio del tono dei pixel perimetrali dello spot;
- il valore mediano dei toni dei pixel di segnale di detta prima zona (TRUE SIGNAL);
- il valore mediano dei toni di pixel perimetrali dello spot;
- il rapporto tra altezza e larghezza del minimo rettangolo circoscritto a detta prima zona (TRUE SIGNAL);
- il numero di pixel costituenti lo spot;
- il numero di pixel perimetrali dello spot;
- il numero di pixel di segnale di detta prima zona (TRUE SIGNAL);
- un fattore di normalizzazione del tono di pixel uguale alla differenza tra il valore mediano del tono dei pixel di detta prima zona (TRUE SIGNAL) e il valore mediano del tono dei pixel perimetrali dello spot; e
- il valore medio (FOMV) di detto valore caratteristico per i pixel di detta prima zona (TRUE SIGNAL).

13. Dispositivo di analisi di immagini rilevate da un micro-array implementante il metodo della rivendicazione 1, comprendente un sistema di array localization configurato secondo un'architettura di rete neurale cellulare per il processamento di pixel di detto spot.

14. Il dispositivo della rivendicazione 13, avente un sistema di estrazione (spot extraction) di spot luminosi su uno sfondo di immagini rilevate da micro-array, comprendente

un sottosistema di scansione (EXTRACTOR) di pixel di un'immagine;

22 NOV. 2002



un sottosistema di determinazione (FEATURES EXTRACTION, CLUSTERING CONDITION) di cluster elementari formati da pixels adiacenti scanditi consecutivamente implementante l'operazione di estrazione (spot extraction) della rivendicazione 5,

un sottosistema di elaborazione (CLUSTERING) di detti cluster elementari, producente in uscita pixels di cluster (CLUSTER 1, ..., CLUSTER N) rappresentanti detti spot.

15. Il dispositivo della rivendicazione 14, avente un sistema di segmentazione (intra-spot segmentation) di spot luminosi su uno sfondo, comprendente

un sottosistema di scansione (EXTRACTOR) di pixel di uno spot;

un sottosistema fuzzy accoppiato al sottosistema di scansione, distinguente i pixel scanditi in pixel di segnale e pixel di sfondo o di rumore implementante il metodo della rivendicazione 6.

16. Il dispositivo della rivendicazione 15, in cui detto sottosistema fuzzy implementa l'operazione di segmentazione (intra-spot segmentation) della rivendicazione 11 e comprende

un sottosistema di determinazione (FEATURES EXTRACTION, CLUSTERING CONDITION) di cluster elementari formati da pixels adiacenti, costituente un sistema fuzzy,

un sottosistema di elaborazione (CLUSTERING) di detti cluster elementari secondo il metodo della rivendicazione 11, producente in uscita pixels di oggetti (CLUSTER 1, ..., CLUSTER N) rappresentati in detto spot.

17. Metodo di identificazione di pixel di un'immagine appartenenti ad uno stesso oggetto rappresentato su uno sfondo, comprendente





22 NOV. 2002

scandire pixel di detta immagine;

calcolare un valore caratteristico per ciascun pixel con un algoritmo fuzzy avente come antecedenti

- il tono di un pixel,
- la distanza tra detto tono e il valore medio del tono di rispettivi pixel di sfondo,
- il quadrato di detta distanza;

e contemplante le operazioni di:

calcolare il valore medio del tono di pixel di sfondo;

giudicare detti pixel come appartenenti ad uno stesso oggetto se detto valore caratteristico eccede una soglia prestabilita.

18. Il metodo della rivendicazione 17, in cui ciascun antecedente ha tre funzioni membro (membership).

19. Il metodo della rivendicazione 18, in cui dette funzioni membro (membership) sono funzioni gaussiane aventi media e varianza predeterminate.

20. Il metodo della rivendicazione 17, in cui detto algoritmo fuzzy ha cinque conseguenti.

21. Metodo di segmentazione (intra-spot segmentation) di spot luminosi su uno sfondo di un'immagine rilevata da un micro-array, comprendente l'operazione di esaminare ciascuno spot utilizzando il metodo della rivendicazione 17 per distinguere pixel di oggetti rappresentati in uno spot da pixel di sfondo o di rumore.

22. Il metodo della rivendicazione 17, comprendente:

scandire (GENERAL CLUSTERING) pixel di un'immagine per



22 NOV. 2002

colonna o per riga, associando a pixels adiacenti scanditi consecutivamente e giudicati appartenenti ad uno stesso oggetto, una rispettiva quadrupla definente un cluster elementare costituita da un numero identificativo (INDEX), coordinate minima ( $x_{min}$ ) e massima ( $x_{max}$ ) e numero di colonna o di riga (y);

individuare (MERGE1) per ogni cluster elementare (INDEX=C) in una certa colonna o riga (i+1) un insieme di cluster elementari (S) nella colonna o riga immediatamente precedente (i) confinanti con detto cluster elementare (INDEX=C);

individuare in detto insieme di cluster elementari (S) un cluster "vincitore" (INDEX=W) che ha il maggior numero di pixel di confine con detto cluster elementare (INDEX=C) e cluster "perdenti" diversi da detto cluster "vincitore", porre il numero identificativo di detto cluster elementare uguale al numero identificativo di detto cluster "vincitore" (W);

porre (MERGE2) il numero identificativo di ciascuno dei cluster perdenti uguale al numero identificativo del rispettivo cluster vincitore (W);

separare (CLUSTER SORTING, CLUSTER EXTRACTION) pixel di oggetti rappresentati in detta immagine da pixel di sfondo estraendo pixel di cluster aventi lo stesso numero identificativo.

23. Il metodo della rivendicazione 21, in cui detta operazione di segmentazione (intra-spot segmentation) comprende l'operazione di definire preliminarmente con detto criterio prestabilito in ciascuno spot una prima zona (TRUE SIGNAL) contenente pixel di segnale ed una seconda zona (FALSE SIGNAL) contenente pixel di sfondo o di rumore.

24. Il metodo della rivendicazione 23, comprendente calcolare per



22 NOV. 2002

ciascuno spot parametri caratteristici ed indici di qualità scelti nell'insieme composto da:

- il valore medio del tono dei pixel di segnale di detta prima zona (TRUE SIGNAL);
- le coordinate del baricentro dello spot;
- il valore medio del tono dei pixel perimetrali dello spot;
- il valore mediano dei toni dei pixel di segnale di detta prima zona (TRUE SIGNAL);
- il valore mediano dei toni di pixel perimetrali dello spot;
- il rapporto tra altezza e larghezza del minimo rettangolo circoscritto a detta prima zona (TRUE SIGNAL);
- il numero di pixel costituenti lo spot;
- il numero di pixel perimetrali dello spot;
- il numero di pixel di segnale di detta prima zona (TRUE SIGNAL);
- un fattore di correzione uguale alla differenza tra il valore mediano del tono dei pixel di detta prima zona (TRUE SIGNAL) e il valore mediano del tono dei pixel perimetrali dello spot; e
- il valore medio (FOMV) di detto valore caratteristico per i pixel di detta prima zona (TRUE SIGNAL).

25. Metodo di analisi di immagini rilevate da un micro-array sotto forma di uno o più spot luminosi su uno sfondo, comprendente le seguenti operazioni:

determinare forme e relative posizioni di detti spot sull'area sensibile di detto micro-array (array localization) generando una mappa binaria di pixels definente confini di detti spot luminosi su detto sfondo,

22 NOV. 2002



isolare ciascuno di detti spot mediante un'operazione di estrazione (spot extraction) usando detta mappa binaria,

esaminare ciascuno spot mediante un'operazione di segmentazione (intra-spot segmentation) utilizzando un criterio di similitudine prestabilito,

per ciascuno di detti spot, determinare relativi parametri caratteristici ed indici di qualità,

caratterizzato dal fatto che detta operazione di segmentazione (intra-spot segmentation) è eseguita secondo il metodo della rivendicazione 21.

26. Sistema di identificazione di pixel di un'immagine appartenenti ad uno stesso cluster rappresentato su uno sfondo, comprendente

un sottosistema di scansione (EXTRACTOR) di pixel di immagine;

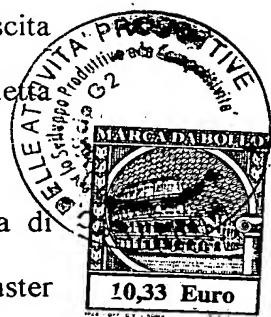
un sottosistema fuzzy accoppiato al sottosistema di scansione ed identificante i pixel scanditi come pixel appartenenti ad uno stesso oggetto implementando il metodo della rivendicazione 17.

27. Il sistema della rivendicazione 26, in cui detto sottosistema fuzzy implementa il metodo della rivendicazione 22 e comprende

un sottosistema di determinazione (FEATURES EXTRACTION, CLUSTERING CONDITION) di cluster elementari formati da pixels adiacenti, costituente un sistema fuzzy,

un sottosistema di elaborazione (CLUSTERING) di detti cluster elementari secondo il metodo della rivendicazione 22, producente in uscita pixels di oggetti (CLUSTER 1, ..., CLUSTER N) rappresentati in detta immagine.

28. Il sistema della rivendicazione 26, in cui detto sottosistema di determinazione (FEATURES EXTRACTION, CLUSTERING CONDITION) di cluster



CAMERA DI COMMERCIO  
INDUSTRIA ARTIGIANATO AGRICOLTURA  
Ufficio Brevetti e Marchi  
**VARESE**

VA/ 2002/A/ 0060



22 NOV. 2002

elementari costituisce un sistema fuzzy implementante il metodo di segmentazione (intra-spot segmentation) della rivendicazione 21.

\*\*\*\*\*

p.p. STMicroelectronics S.r.l.

Il Mandatario Gaetano Barbaro  
Gaetano BARBARO  
N° Iscr. Albo 994 B

(Società Italiana Brevetti S.p.A.)

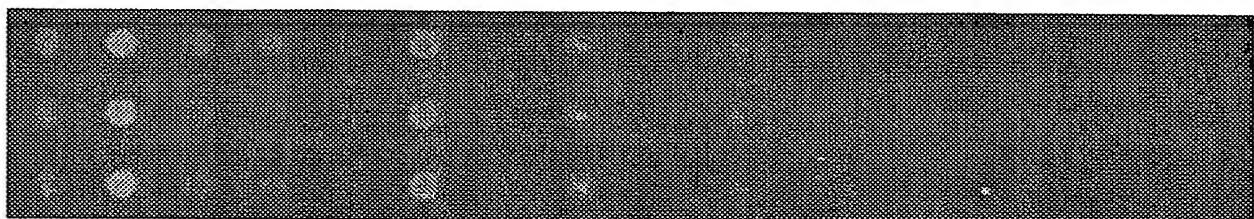
BI345V



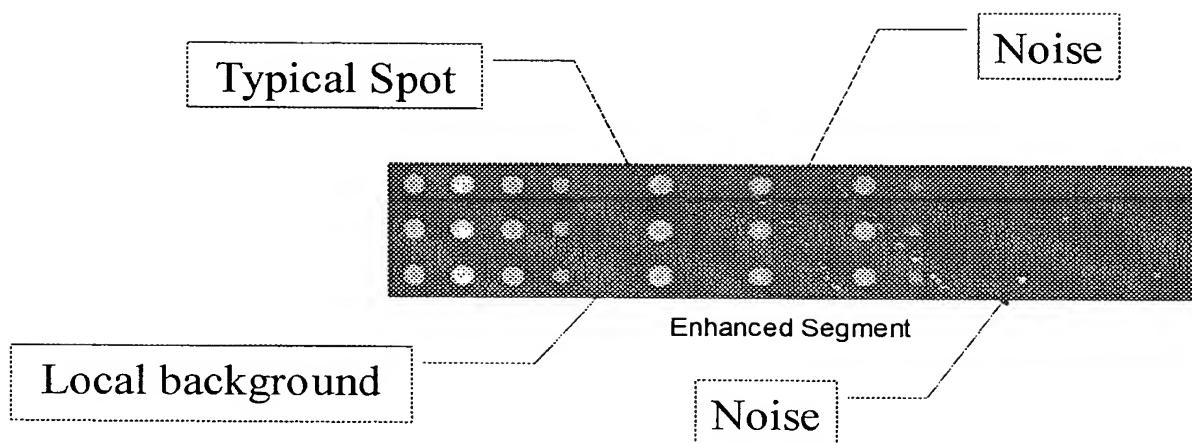
*Giuliano De Zorzi*  
*Domenico De Marin*



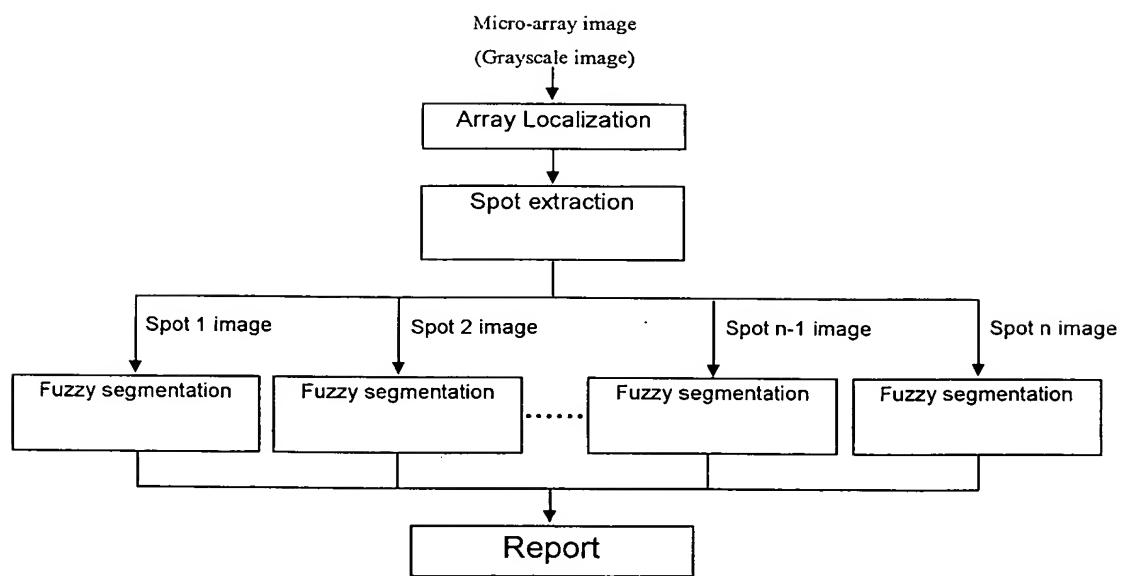
22 NOV. 2002



**FIG. 1**



**FIG. 2**



D. [Signature]  
Luisa De Zorzi

**FIG. 3**

Gaetano Barbaro  
Gaetano BARBARO  
N° Iscr. Albo 994 B

22 NOV. 2002



Nome	Structuring set	Direzione
OpeningD1		( $d_1$ )
OpeningD2		( $d_2$ )
OpeningX		(x)
OpeningY		(y)

FIG. 4

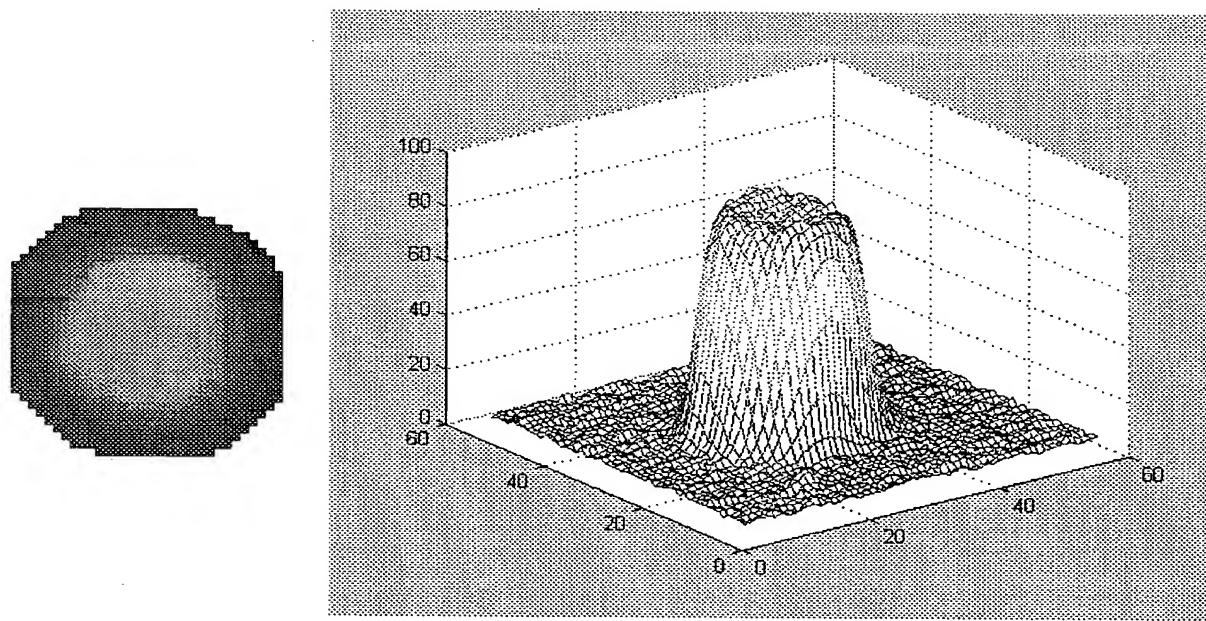


FIG. 5



22/11/02 00 2002

Gaetano Barbaro  
Gaetano BARBARO  
N° Iscr. Albo 994 B

22 NOV. 2002

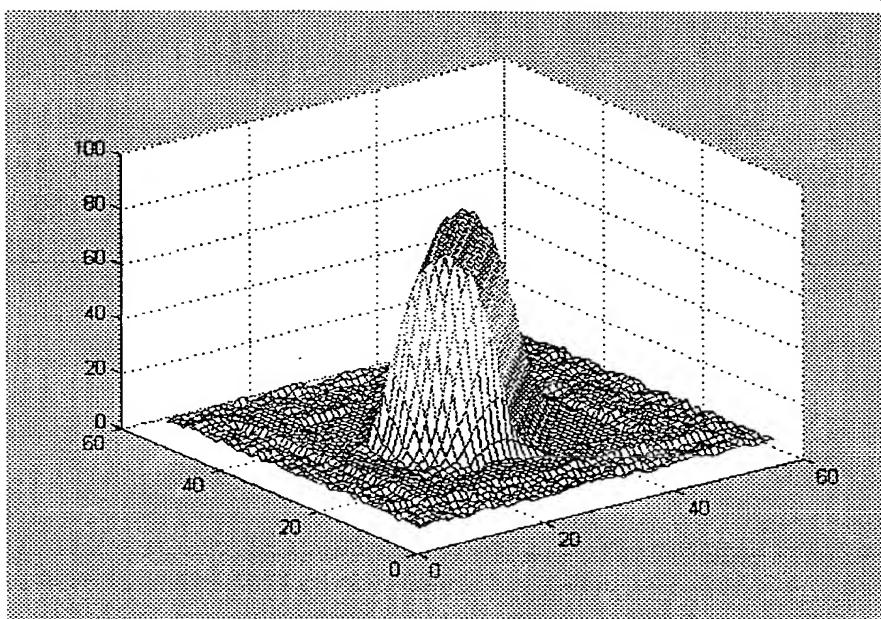
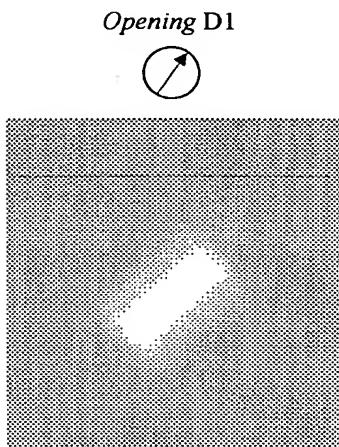


FIG. 6

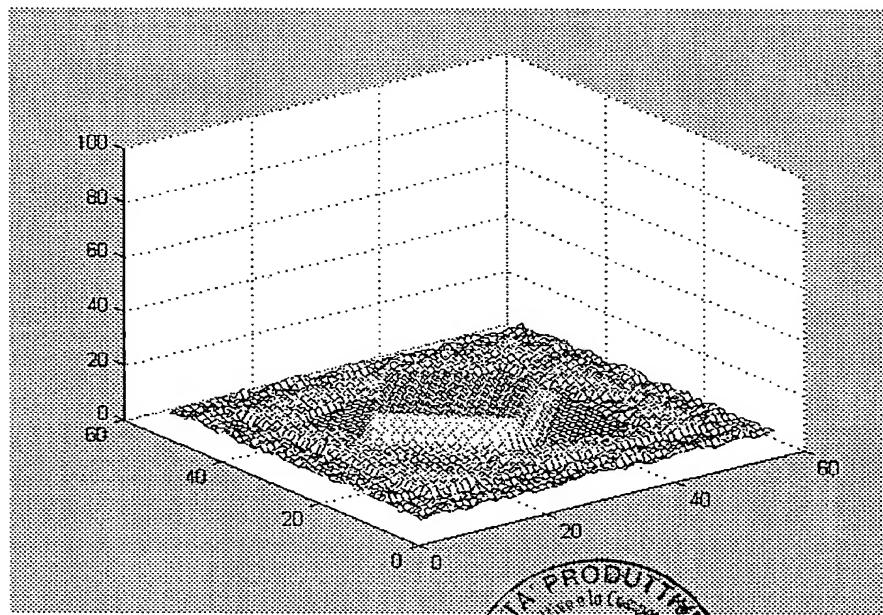
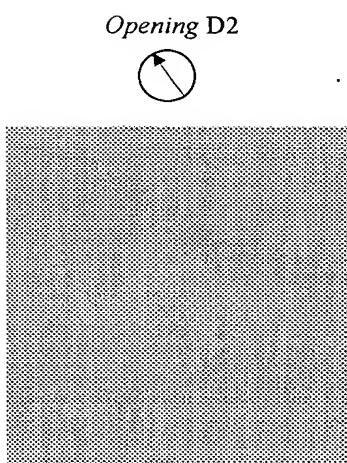


FIG. 7



Gaetano Barbaro  
Gaetano BARBARO  
N° Iscr. Albo 994 B

22 NOV. 2002

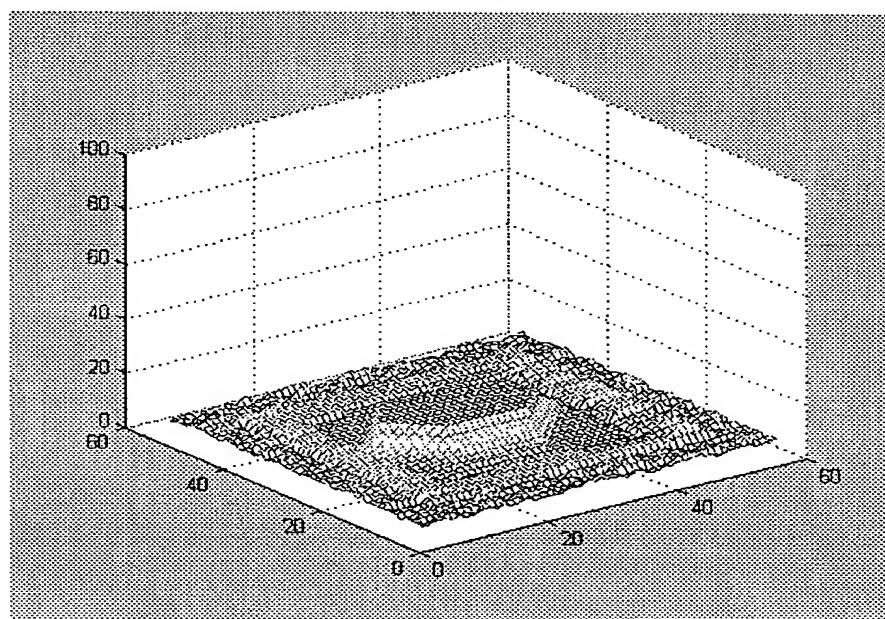
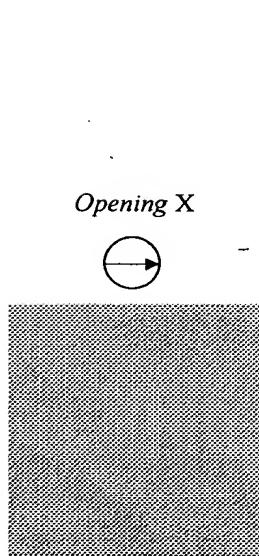


FIG. 8

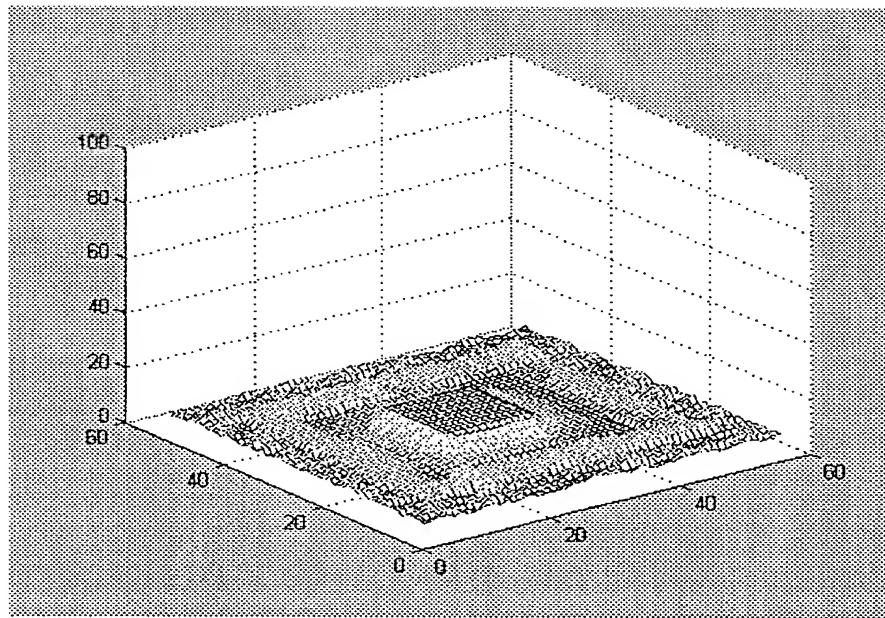
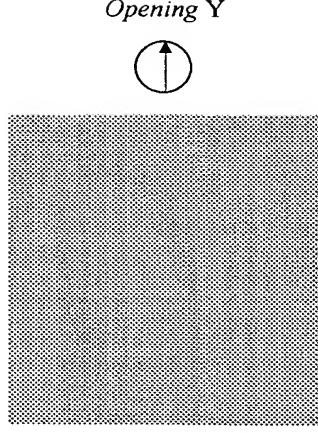


FIG. 9



Gaetano BARBARO  
N° Iscr. Albo 994 B

22 NOV. 2002

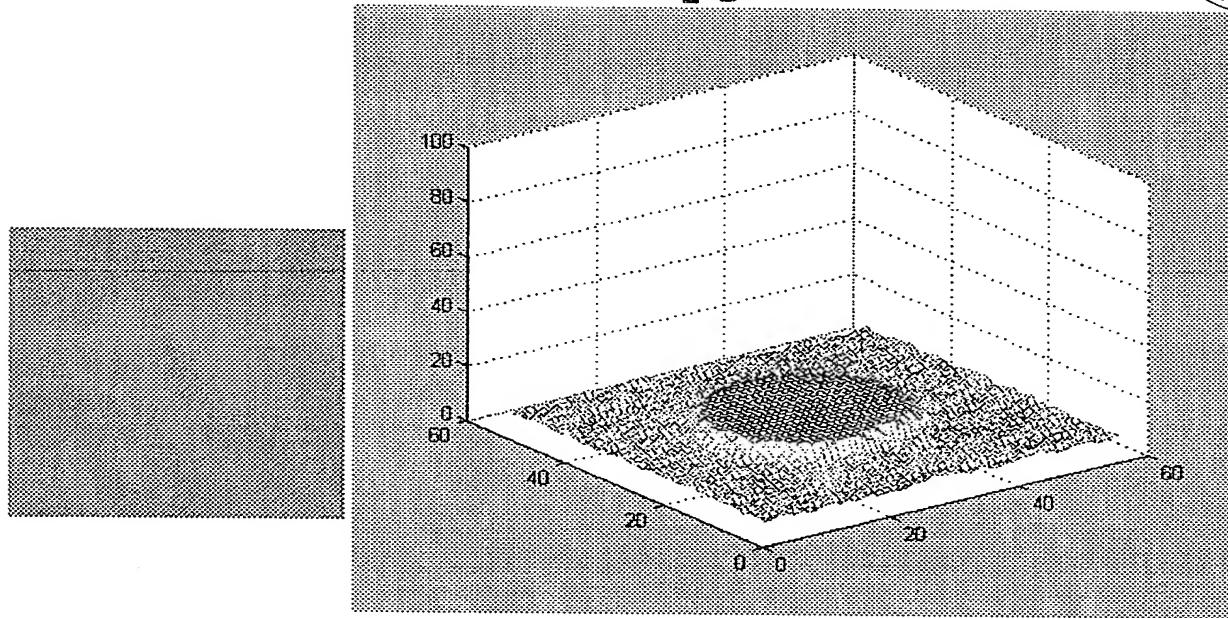


FIG. 10

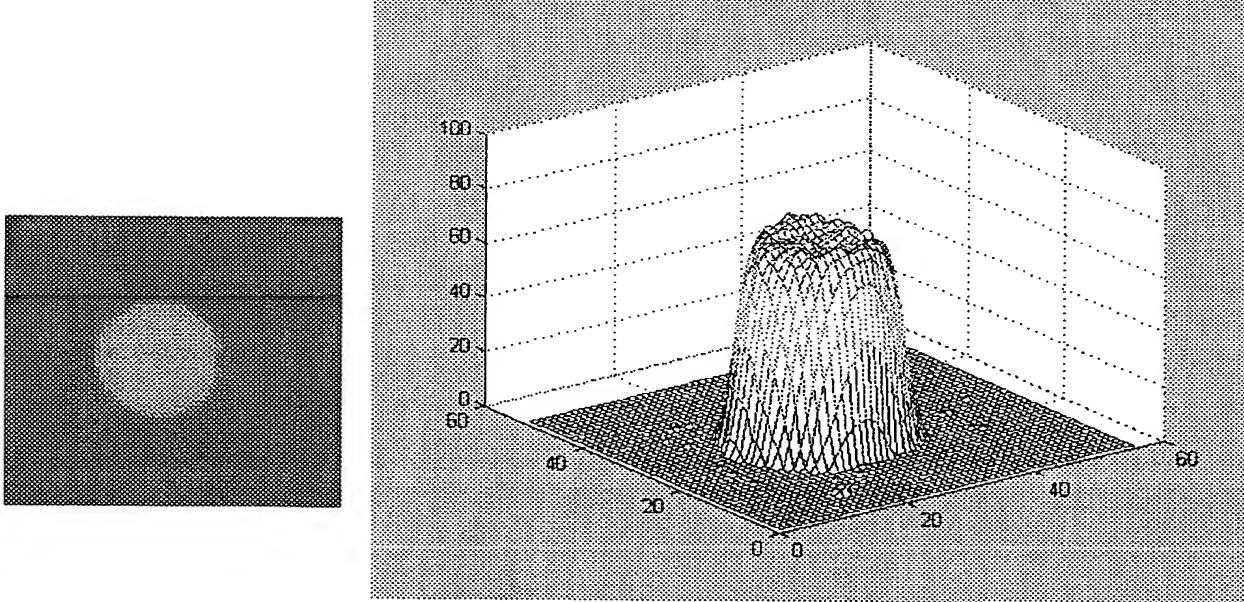


FIG. 11

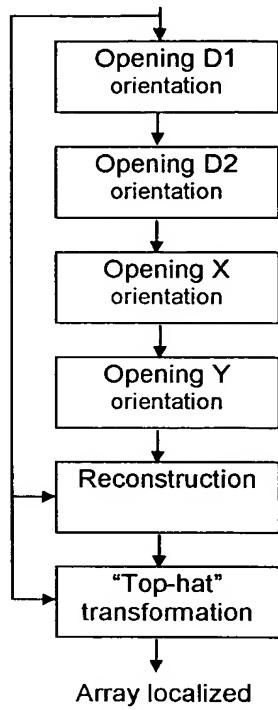


*Gaetano Barbaro*

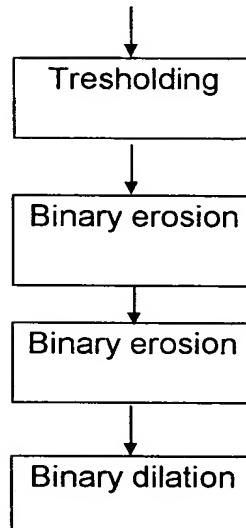
Gaetano BARBARO  
N° Iscr. Albo 994 B



Micro array image



Array localized



Array localized and local surrounding

FIG. 12

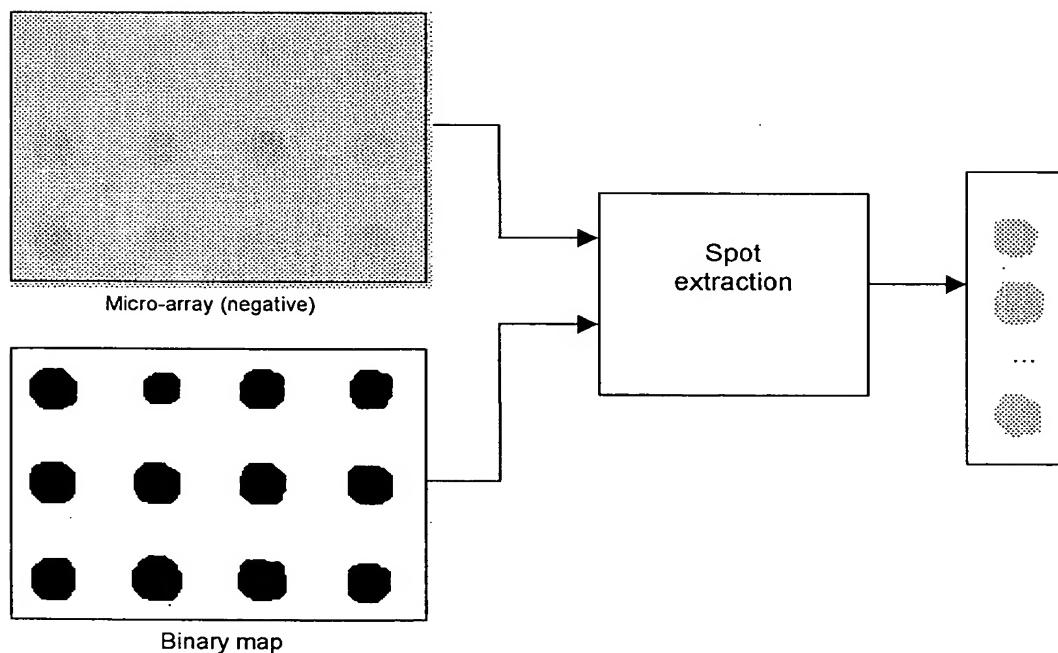


FIG. 13



*[Handwritten signatures]*

Gaetano Barbaro  
Gaetano BARBARO  
N° Iscr. Albo 994 B

22 NOV. 2002

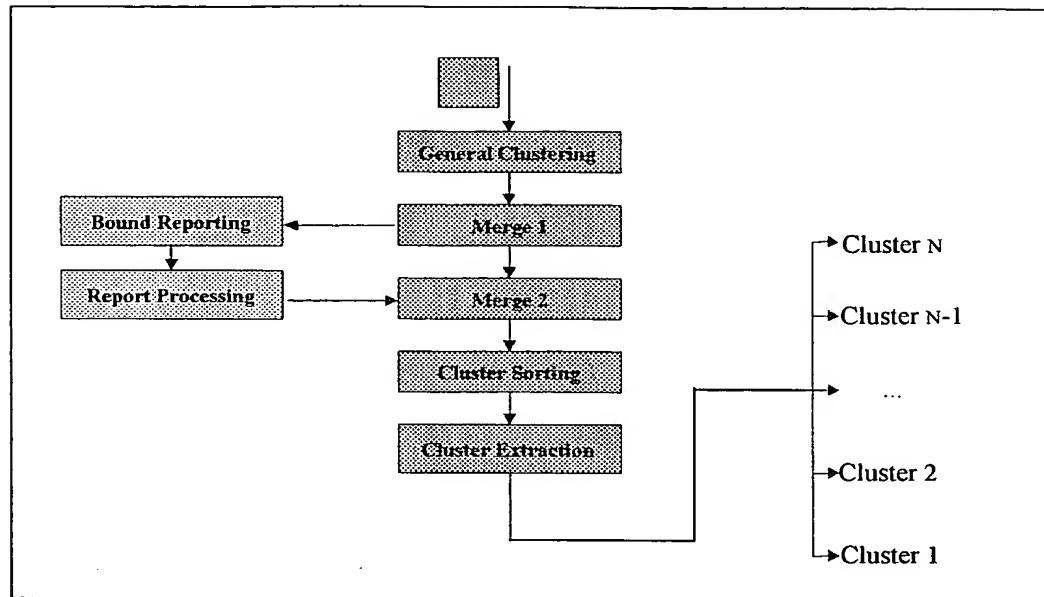


FIG. 14

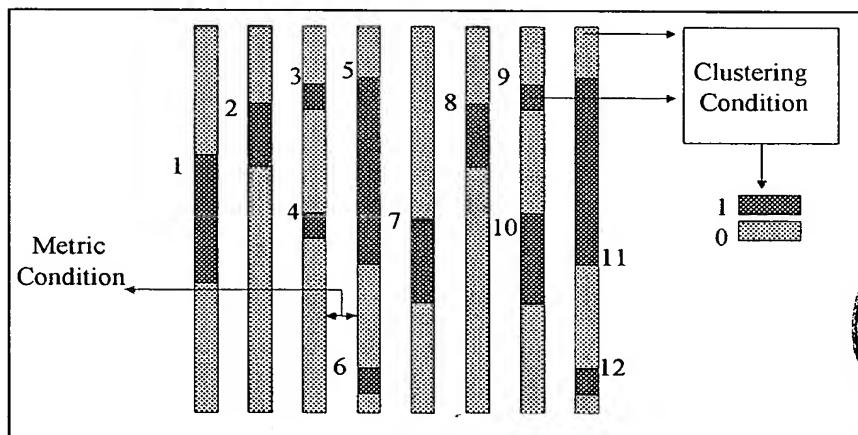


FIG. 15



*Riccardo Corzani*

Gaetano Barbaro  
Gaetano BARBARO  
N° Iscr. Albo 994 B

22 NOV. 2002

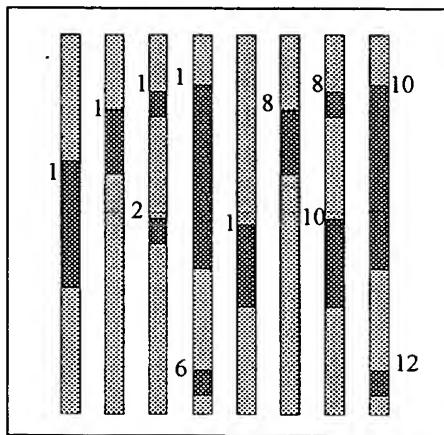


FIG. 16

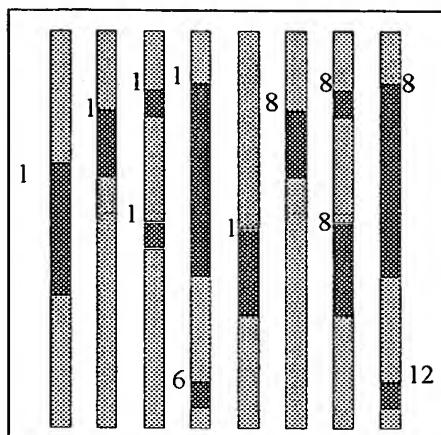


FIG. 17

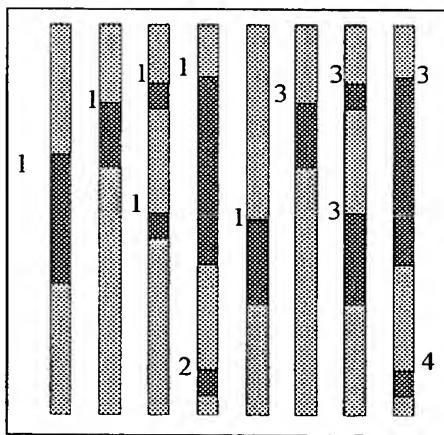


FIG. 18

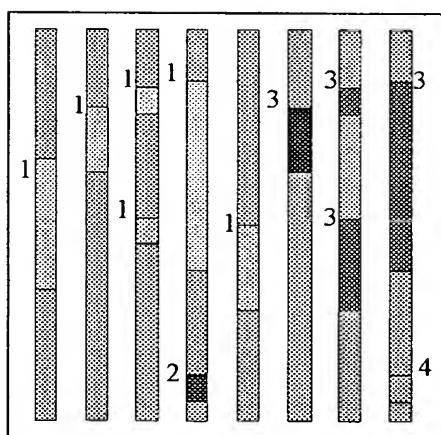


FIG. 19



*[Handwritten signature]*

*Gaetano Barbero*  
Gaetano BARBARO  
N° Iscr. Albo 994 B

CAMERA DI COMMERCIO  
INDUSTRIA ARTIGIANATO AGRICOLTURA  
Ufficio Brevetti e Marchi  
VARESE

22 NOV. 2002

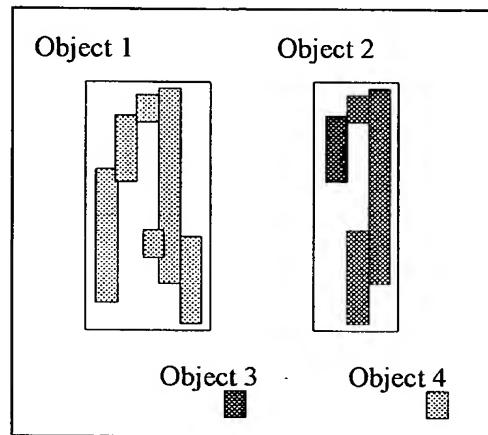


FIG. 20

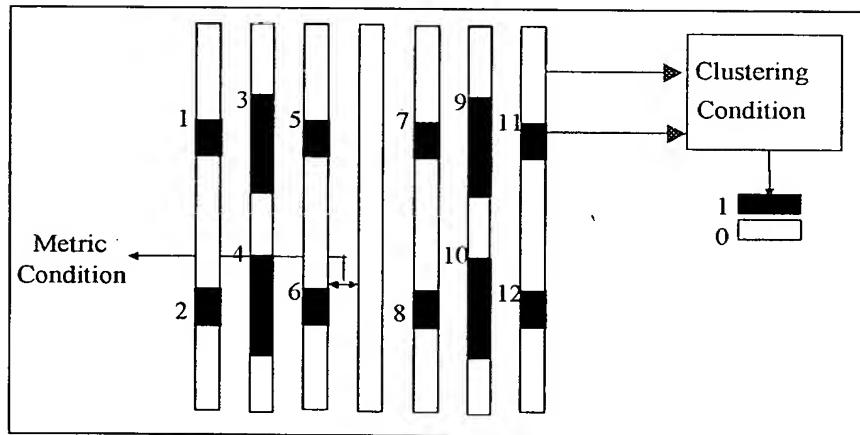


FIG. 21

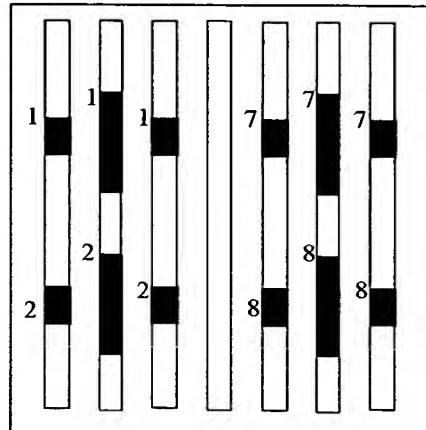


*[Handwritten signature]*  
Gaetano BARBARO  
N° Iscr. Albo 994 B

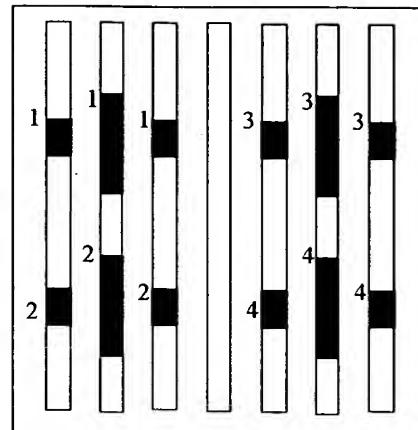
*Gaetano Barbaro*  
Gaetano BARBARO  
N° Iscr. Albo 994 B



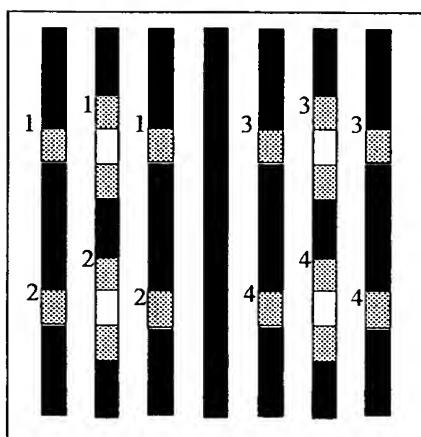
22 NOV. 2002



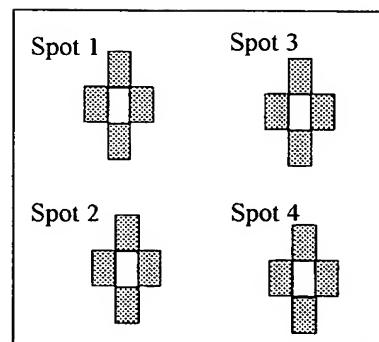
**FIG. 22**



**FIG. 23**



**FIG. 24**



**FIG. 25**



Aut. 1  
Aut. 2  
Aut. 3  
Aut. 4

Gaetano Barbaro  
Gaetano BARBARO  
N° Iscr. Albo 994 B

22 NOV. 2002

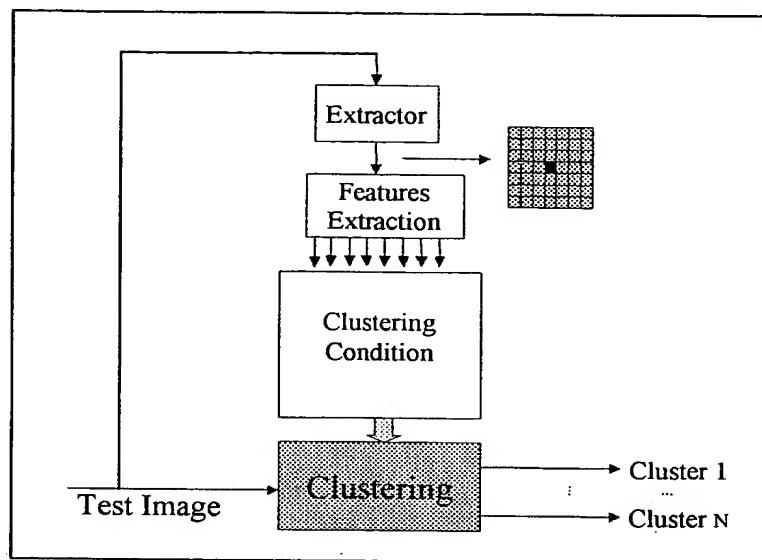


FIG. 26

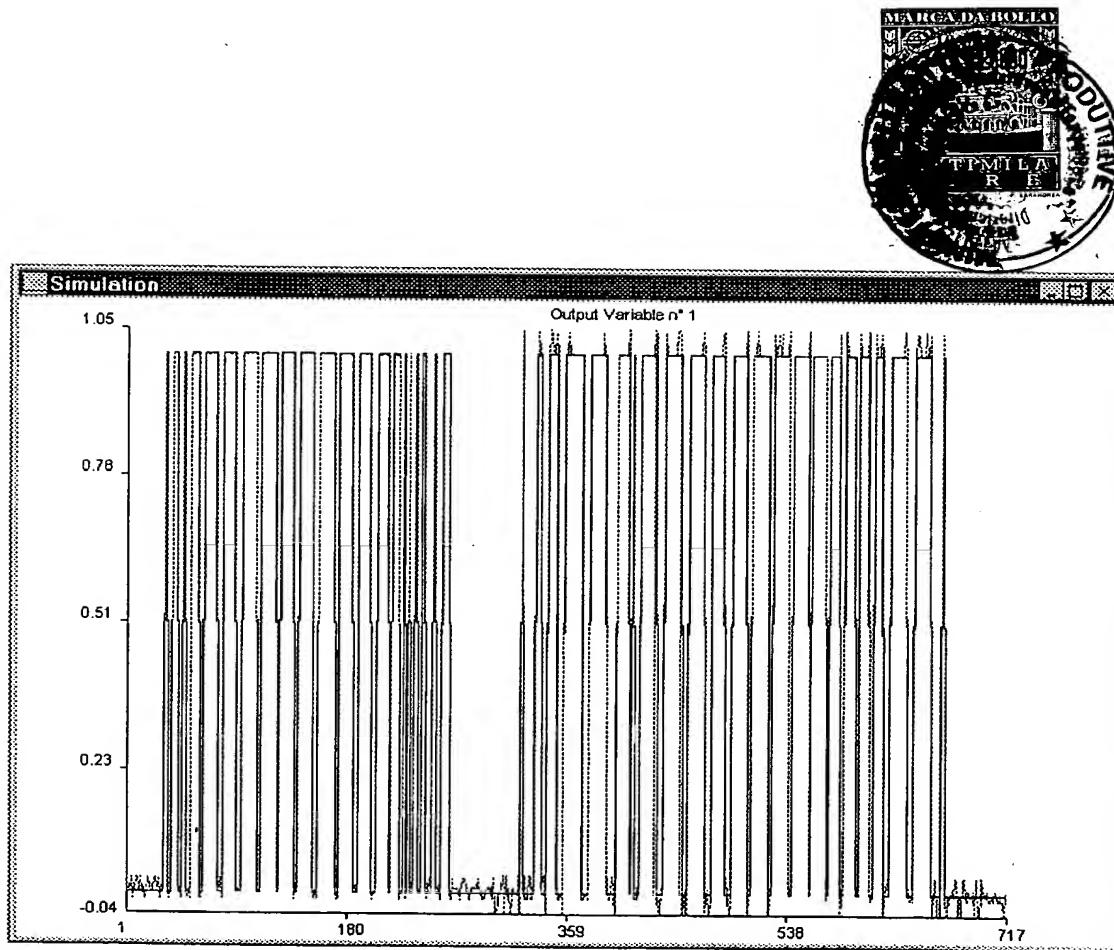


FIG. 27

*Gaetano Barbaro*  
Gaetano BARBARO  
N° Iscr. Albo 994 B



22 NOV. 2002

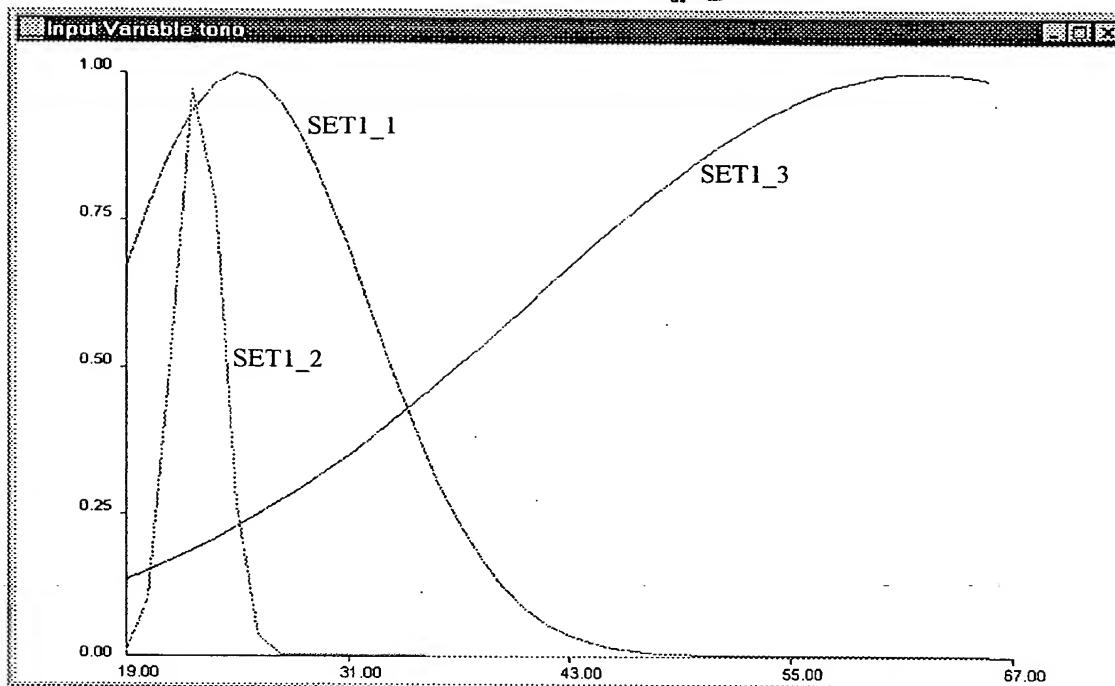


FIG. 28

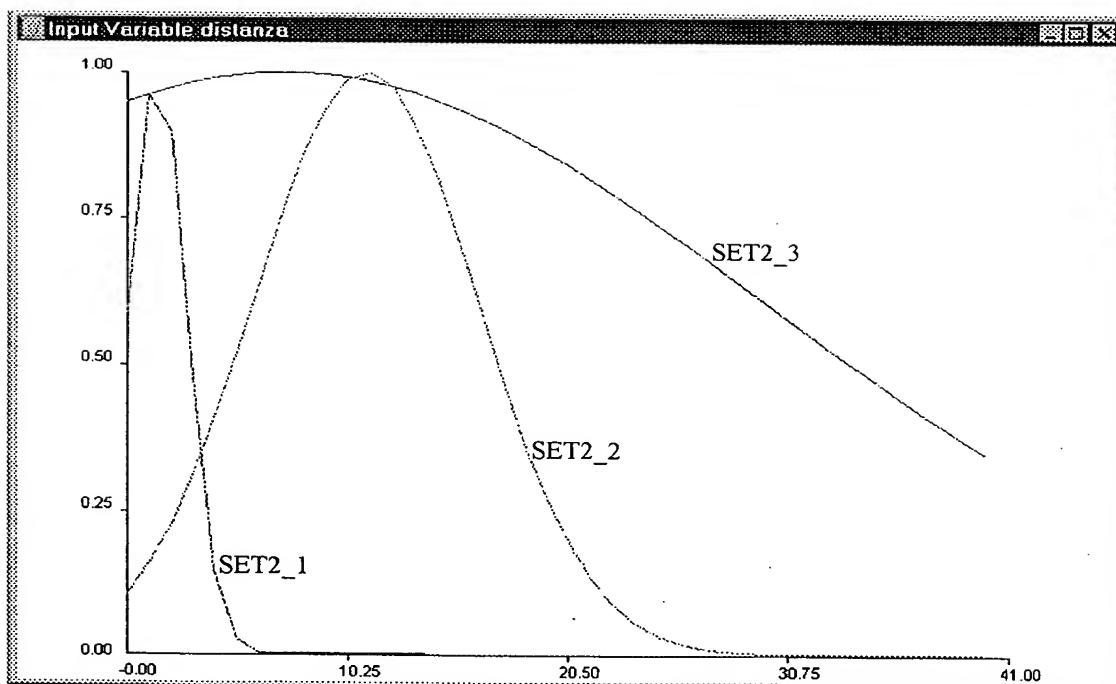


FIG. 29



*R. BARBARO*  
Gaetano BARBARO  
N° Iscr. Albo 994 B

22 NOV. 2002

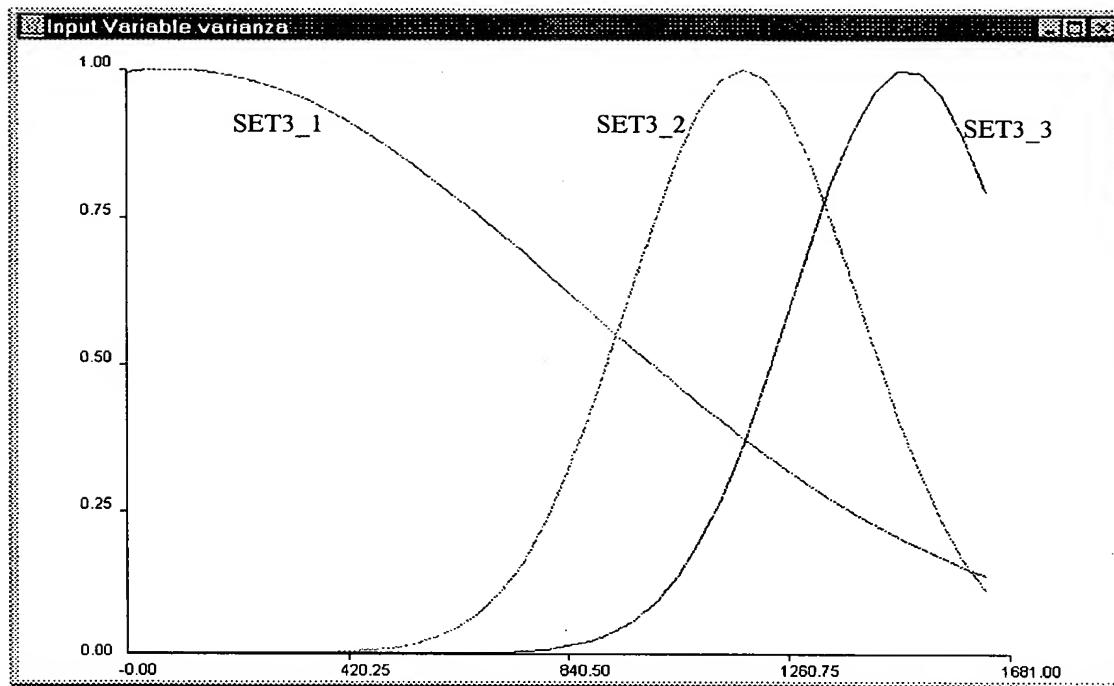


FIG. 30

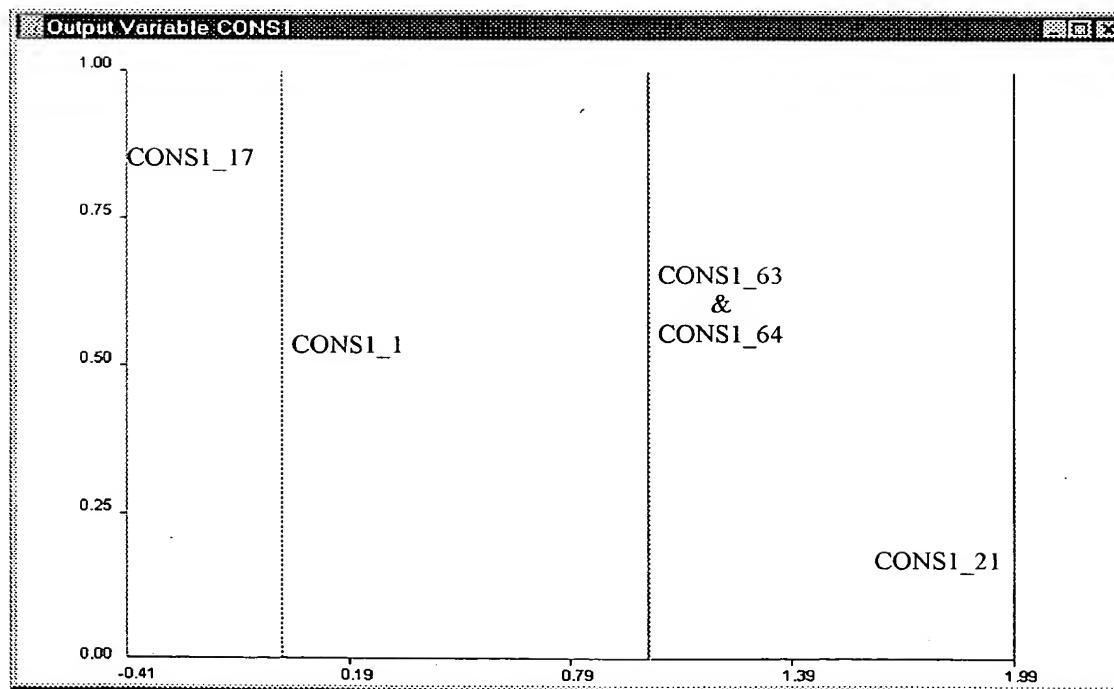
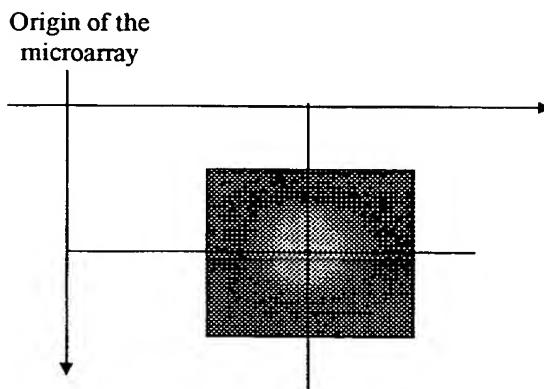


FIG. 31

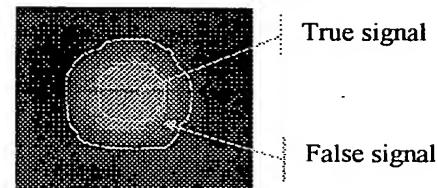


*Gaetano Barbaro*  
Gaetano BARBARO  
N° Iscr. Albo 994 B

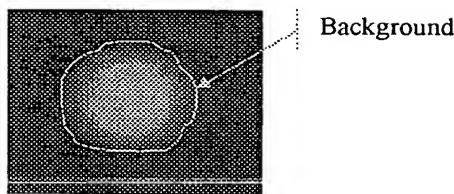
22 NOV. 2002



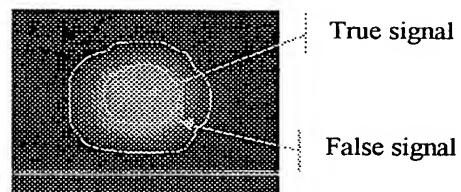
**FIG. 32**



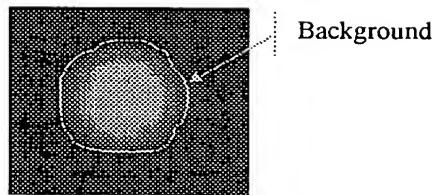
**FIG. 33**



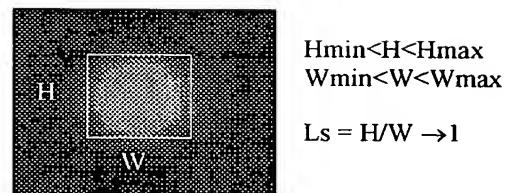
**FIG. 34**



**FIG. 35**



**FIG. 36**



**FIG. 37**



*[Handwritten signature]*  
22 NOV. 2002  
Gaetano BARBARO

Gaetano Barbaro  
Gaetano BARBARO  
N° Iscr. Albo 994 B

22 NOV. 2002

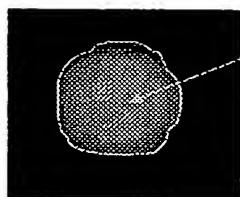


FIG. 38

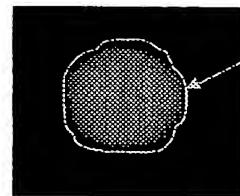


FIG. 39

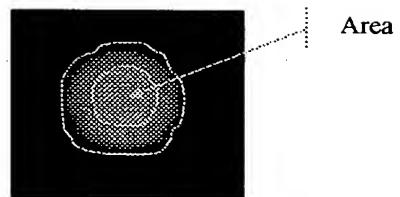
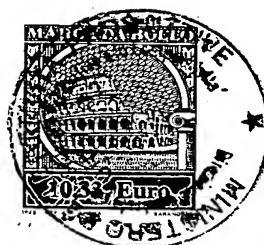


FIG. 40



2003  
Gaetano Barbaro

Gaetano Barbaro  
N° Iscr. Albo 994 B